



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 625**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/315 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01996301 .6**

96 Fecha de presentación : **28.12.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1355918**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.10.2003**

54 Título: **Proteína protectora recombinante de \$I (*Streptococcus pneumoniae*).**

30 Prioridad: **28.12.2000 US 258841 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.05.2011

73 Titular/es: **WYETH L.L.C.**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

72 Inventor/es: **Green, Bruce, A. y**
Masi, Amy, W.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 625 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteína protectora recombinante de \$I (streptococcus pneumoniae)

campo de la invención

- 5 La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos referentes a una proteína de *Streptococcus pneumoniae* que tiene un peso molecular de 20 kilodalton (kDa). La presente invención también se refiere a composiciones para el tratamiento y la profilaxis de infección o inflamación asociada a infección bacteriana.

Antecedentes de la invención

- 10 El oído medio es una cavidad llena de aire estéril separada del oído externo por la membrana del tímpano. Unida a la membrana del tímpano hay tres huesecillos del oído que vibran cuando las ondas del sonido golpean la membrana del tímpano. Las vibraciones se transmiten al oído interno, que genera impulsos nerviosos que son enviados al cerebro. El aire puede entrar en el oído medio por la trompa de Eustaquio, que se abre en las paredes de la nasofaringe.

- 15 La nasofaringe está localizada posterior a las fosas nasales. La nasofaringe está revestida de epitelio respiratorio y epitelio escamoso estratificado. Debajo del epitelio respiratorio, el abundante tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) forma la amígdala nasofaríngea (adenoides).

- 20 La infección o inflamación bacteriana del oído medio se observa principalmente en niños. Debido al aislamiento del oído medio, se sugiere que el desarrollo de infecciones del oído medio requiere la participación de la nasofaringe y la trompa de Eustaquio. Las infecciones por *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) son una de las causas principales de infecciones del oído medio, además de bacteriemia, meningitis y neumonía mortal en todo el mundo (Butler, J.C. y col., American Journal of Medicine, 1999, 107:69S-76S). La rápida aparición de cepas neumocócicas multirresistentes en todo el mundo ha conducido al aumento del énfasis en la prevención de infecciones neumocócicas por vacunación (Goldstein y Garau, Lancet, 1997, 350:233-4).

- 25 Los antígenos de la proteína de *S. pneumoniae* se han evaluado para la eficacia protectora en modelos animales de infección neumocócica. Algunos de los candidatos a vacuna más comúnmente estudiados incluyen las proteínas PspA, lipoproteína PsaA y la proteína CbpA. Numerosos estudios han mostrado que la proteína PspA es un factor de virulencia (Crain, M.J. y col., Infect Immun, 1990, 58:3293-9; McDaniel, L.S. y col., J Exp Med, 1984, 160:386-97), pero es antigénicamente variable entre cepas neumocócicas. Adicionalmente, un estudio reciente ha indicado que algunas regiones antigénicamente conservadas de una variante recombinante de PspA pueden provocar anticuerpos de reactividad cruzada en adultos humanos (Nabors, G.S. y col., Vaccine, 2000, 18:1743-1754). La PsaA, una lipoproteína de 37 kDa con similitud con otras adhesinas Gram-positivas, participa en el transporte de manganeso en neumococos (Dintilhac, A. y col., Molecular Microbiology, 1997, 25(4):727-739; Sampson, J.S. y col., Infect Immun, 1994, 62:319-24) y se ha mostrado que es protectora en modelos de ratón de enfermedad sistémica (Talkington, D.F. y col., Microb Patog, 1996, 21:17-22). La proteína de unión a colina expuesta en la superficie, CbpA, está antigénicamente conservada y también es protectora en modelos de ratón de enfermedad neumocócica (Rosenow, C. y col. Molecular Microbiology, 1997, 25:819-29). Como la colonización nasofaríngea es un requisito previo para la enfermedad ótica, la inmunización intranasal de ratones con proteínas neumocócicas y adyuvantes de la mucosa apropiados se ha usado para potenciar la respuesta de anticuerpos de la mucosa y, por tanto, la eficacia de candidatos a vacunas de proteína (Briles, D.E. y col., Infect Immun, 2000, 68:796-800; Yamamoto, M. y col., A J Immunol, 1998, 161:4115-21).

- 35 La vacuna de polisacáridos capsulares neumocócicos 23-valente actualmente disponible no es eficaz en niños de menos de 2 años de edad o en pacientes inmunodeprimidos, dos de las principales poblaciones en riesgo de infección neumocócica (Douglas, R.M. y col., Journal of Infectious Diseases, 1983, 148:131-137). Se mostró que una vacuna de conjugado de polisacárido-proteína neumocócico 7-valente era altamente eficaz en bebés y niños contra enfermedad neumocócica sistémica producida por los serotipos de vacuna y contra serotipos capsulares de reactividad cruzada (Shinefield y Black, Pediatr Infect Dis J, 2000, 19:394-7). Los siete tipos capsulares cubren más del 80% de las cepas aisladas de enfermedad en los Estados Unidos, pero sólo el 57-60% de las cepas aisladas de enfermedad en otras áreas del mundo (Hausdorff, W.P. y col., Clinical Infectious Diseases, 2000, 30:100-21). Por tanto, hay una necesidad inmediata de una vacuna que cubra la mayoría o todos los serotipos que producen enfermedad de neumococos.

- 50 El hierro es un elemento esencial para la colonización e infección por muchas bacterias patógenas. La prevención del proceso de adquisición debería producir una reducción de la colonización y un menor potencial de enfermedad. Los complejos de adquisición de hierro en patógenos satisfactorios tales como, pero no se limitan a, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *M. catarrhalis* y *H. influenzae* han sido evaluados para su potencial de vacuna por otros laboratorios (Conte, M.P. y col., Infection and Immunity, 1999, 64:3925; Gray-Owens, S.D. y col. Infection and Immunity, 1995, 64:1201; Luke N.R. y col., Infection and Immunity, 1999, 67:681; Pettersson, A. y col., Infection and Immunity, 1993, 61: 4724). Por tanto, el aislamiento de las estructuras responsables de la adquisición de hierro podría conducir a candidatos a vacuna.

Previamente se ha descrito la prevención de la colonización de *S. pneumoniae* como estrategia en la prevención de infecciones. Se han descrito diferentes proteínas asociadas a la superficie que participan en la unión de la bacteria de la superficie de la mucosa en el tracto respiratorio superior. En particular, Briles y col. (Vaccine, Butterworth Scientific. Guildford, GB, volumen 19, 8 de diciembre de 2000, páginas S87-S95) describen que la proteína PspA tiene eficacia contra otitis media en animales. Briles y col., (Vaccine, Butterworth Scientific. Guildford, GB, volumen 18, 16 de febrero de 2000, páginas 1707-1711) muestran varias proteínas neumocócicas que provocan la protección en ratones que incluyen PspA, neumolisina, PsaA y PspC. Hammerschmidt Sven y col., (Infection and Immunity, volumen 67, no 4, abril de 1999, páginas 1683-1687) describen que la PspA actúa de proteína de unión a lactoferrina humana y sugiere que la *S. pneumoniae* puede usar la interacción lactoferrina humana-PspA para vencer la limitación del hierro en las superficies de la mucosa debido a la presencia de lactoferrina, representando quizás un posible mecanismo de virulencia. Finalmente, Gosink Khoosheh K y col., (Infection and Immunity, volumen 68, no 10, octubre de 2000, páginas 590-5695) describen varias proteínas de unión a colina, algunas de las cuales se encontró que participaban en la colonización de *S. pneumoniae*.

Resumen de la invención

La presente invención contempla una proteína neumoprotectora (PPP) aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad de reducir la colonización de bacterias neumocócicas.

La presente invención contempla una PPP recombinante asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro.

La presente invención contempla una PPP recombinante asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; en la que la PPP tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587.

La presente invención contempla una PPP recombinante asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la PPP tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587 y una carga de aproximadamente -14,214 a pH 7.

La presente invención también contempla una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro.

La presente invención también contempla una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; en la que la secuencia de ácidos nucleicos tiene una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro.

La presente invención también contempla un ADNc que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; en la que la secuencia de ácidos nucleicos tiene una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro.

La presente invención contempla un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención también contempla un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión, y en la que la PPP tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587.

La presente invención contempla adicionalmente un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que

codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión, y en la que la PPP tiene un punto isoelectrónico de aproximadamente 4,587 y una carga de aproximadamente -14,214 a pH 7.

La presente invención también contempla un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; y en la que la secuencia de ácidos nucleicos está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención también contempla un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; en la que la secuencia de aminoácidos está codificada por la secuencia de ácidos nucleicos como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento de la misma; y en la que la secuencia de ácidos nucleicos está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención contempla una célula huésped transfectada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención contempla adicionalmente una célula huésped transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención también contempla un procedimiento para producir PPP recombinante o fragmento de la misma, procedimiento que comprende aislar la PPP o fragmento de la misma producido por una célula huésped transfectada con un vector de expresión y cultivada en condiciones que proporcionan la expresión de la PPP o fragmento de la misma por el vector, en el que el vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención también contempla un procedimiento para producir PPP recombinante o fragmento de la misma, procedimiento que comprende aislar la PPP o fragmento de la misma producido por una célula huésped transfectada con un vector y cultivada en condiciones que proporcionan la expresión de la PPP o fragmento de la misma por el vector, en el que el vector comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.

La presente invención también contempla una composición que comprende (1) una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también contempla una composición que comprende (1) una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, y teniendo la PPP una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención contempla una composición que comprende (1) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia de ácidos nucleicos tiene una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento de la misma; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención contempla una composición que comprende (1) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también contempla una composición que comprende (1) un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; y retener la función biológica de la interacción con hierro y en la que la secuencia de ácidos nucleicos está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también contempla una composición que comprende (1) una célula huésped transfectada con un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención contempla una composición que comprende (1) una célula huésped transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma; teniendo la PPP o fragmento de la misma la capacidad para reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retener la función biológica de la interacción con hierro, en la que la secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión; en la que la PPP o fragmento de la misma tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma; y (2) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma, teniendo la PPP un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma, teniendo la PPP un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587 y una carga de aproximadamente -14,214 a pH 7; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae*, o un fragmento de la misma, teniendo la PPP o fragmento de la misma una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma, estando la PPP o fragmento de la misma codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que tiene una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*.

- La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*; en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en otitis media, rinosinusitis, bacteriemia, meningitis, neumonía e infección del tracto respiratorio inferior.
- La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*; en la que la PPP o fragmento de la misma comprende una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento inmunogénico de la misma.
- La presente invención también contempla una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma, en la que la PPP o fragmento de la misma es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la bacteria neumocócica es *Streptococcus pneumoniae*.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que la composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*; en la que la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en otitis media, rinosinusitis, bacteriemia, meningitis, neumonía e infección del tracto respiratorio inferior.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, en la que la PPP tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, en la que la PPP tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587 y tiene una carga de aproximadamente 14,214 a pH 7; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP o fragmento de la misma en la que vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP o fragmento de la misma en la que el vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5; o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
- La presente invención contempla una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o fragmento de la misma, en la que el vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos representada en SEC ID N°: 4, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente

aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención contempla una composición para uso en inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero; en la que la composición comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención contempla una composición para uso en inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero; en la que la composición comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* o un fragmento de la misma cuya PPP tiene una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento inmunogénico de la misma; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención contempla una composición para uso en inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero; en la que la composición comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, teniendo la PPP un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,582; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.

La presente invención contempla una composición para uso en inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero; en la que la composición comprende (i) al menos un vector de expresión que codifica una PPP; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante; en la que dicho vector de expresión comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento inmunogénico de la misma.

La presente invención contempla un compuesto para uso en inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que está infectado por bacterias neumocócicas eficaz para inhibir la unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 para inducir la respuesta inmunitaria en el mamífero.

La presente invención también contempla un procedimiento para cribar un compuesto que induce una respuesta inmunitaria en un mamífero infectado por bacterias neumocócicas, comprendiendo el procedimiento comparar una primera cantidad de unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 en presencia del compuesto con una segunda cantidad de unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 en ausencia del compuesto; por lo que una primera cantidad de unión más baja que la segunda cantidad de unión indica que el compuesto puede inducir la respuesta inmunitaria en el mamífero.

La presente invención también contempla un procedimiento para diagnosticar infección bacteriana neumocócica, comprendiendo el procedimiento comparar el nivel de PPP como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en una muestra de la que se sospecha con el nivel de PPP como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en una muestra de control, por lo que un nivel de la proteína neumoprotectora en la muestra sospechosa superior al nivel de la proteína neumoprotectora en la muestra de control indica que la muestra sospechosa comprende infección bacteriana neumocócica.

La presente invención contempla un anticuerpo que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae*.

La presente invención también contempla un anticuerpo quimérico que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma.

La presente invención también contempla un anticuerpo humanizado que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma.

La presente invención también contempla un anticuerpo antiidiotípico que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma.

La presente invención también contempla un anticuerpo que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en el que el anticuerpo está conjugado con un compuesto farmacéuticamente activo.

La presente invención también contempla un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma.

La presente invención también contempla un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en el que el anticuerpo es humanizado.

La presente invención también contempla un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus*

pneumoniae que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en la que el anticuerpo es antiidiotípico.

La presente invención también contempla un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en la que el anticuerpo está conjugado con un compuesto farmacéuticamente activo.

La presente invención contempla un uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, de un anticuerpo antiidiotípico que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, que es eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero.

La presente invención contempla un uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, de un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en el que el anticuerpo es antiidiotípico; eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero.

La presente invención contempla un uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero infectado por bacterias neumocócicas, de un anticuerpo que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en el que el anticuerpo está conjugado con un compuesto farmacéuticamente activo; eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero.

La presente invención también contempla un uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero infectado por bacterias neumocócicas, de un anticuerpo monoclonal que se une a PPP de *Streptococcus pneumoniae* que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en el que el anticuerpo está conjugado con un compuesto farmacéuticamente activo; eficaz para inducir una respuesta inmunitaria en el mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Gel de SDS-PAGE de fracciones de DEAE de lavados con PBS de la cepa 49136 de *S. pneumoniae*. La hilera 1 es patrones sin teñir; la hilera 2 es la fracción n° 8; la hilera 3 es la fracción n° 9; la hilera 4 es la fracción n° 10; la hilera 5 es la fracción n° 11; la hilera 6 es la fracción n° 12; la hilera 7 es la fracción n° 13; la hilera 8 es la fracción n° 19; la hilera 9 es la fracción n° 15; y la hilera 10 es la fracción n° 16. El gel en la Figura 1 muestra la banda de peso molecular pequeño distinta en las fracciones n° 14 y n° 15 (hilera 8 y 9) resueltas por el gel.

Figura 2. Gel de lisado celular completo de la expresión recombinante de pLP533 que muestra expresión del producto deseado. Hilera 1, marcadores preteñidos con Biorad; hilera 2, células sin inducir; hilera 3, células inducidas.

Figura 3. Transferencia Western de lisados celulares completos de varios serotipos que muestra reactividad cruzada y formación de oligómeros. Hilera 1, marcadores preteñidos con Biorad Precision; hilera 2, tipo 3; hilera 3, tipo 4; hilera 4, tipo 9; hilera 5, tipo 14; hilera 6, tipo 19F; hilera 7, tipo 18C; hilera 8, tipo 5; e hilera 9, tipo 23F.

Figura 4. Reducción de la colonización por rPPP1. Las bacterias recuperadas se muestran como log₁₀ UFC/gramo de tejido. Se muestra un error estándar de la media. *Los valores son significativamente diferentes en comparación con el control por la prueba estadística de Tukey-Kramer.

Figura 5. El gel de SDS-PAGE muestra la purificación de rPPP1. Hilera 1, patrones de Bio Rad Precision; hilera 2, diafiltrado; hilera 3, rPPP1 purificada.

Figura 6. Comparación de secuencias de PPP1 de los serotipos de *S. pneumoniae*.

Figura 7. El gel muestra PPP1 amplificada de cultivos *in vitro* e *in vivo*.

Descripción detallada

Las proteínas y los ácidos nucleicos de la presente invención poseen utilidad diagnóstica, profiláctica y terapéutica para enfermedades producidas por infección por *Streptococcus pneumoniae*. Pueden usarse para diseñar sistemas de cribado para compuestos que interfieren con o interrumpen en la interacción de proteínas asociadas a *S. pneumoniae* con hierro. Los ácidos nucleicos y las proteínas también pueden usarse en la fabricación de composiciones contra infección por *S. pneumoniae* y/u otros patógenos cuando se usan para expresar genes extraños.

En la presente invención se ha identificado una proteína recombinante de 20 kDa de *S. pneumoniae* completa que reduce la colonización de *S. pneumoniae*, en un modelo de exposición intranasal. La proteína descrita en este documento se ha llamado proteína neumoprotectora 1 (PPP1). Esta proteína muestra una homología significativa con una proteína de ferretina que contiene no hemo de *L. innocua* que, de manera interesante, es un miembro de la familia Dps de proteínas de unión a ADN (Pikis, A. y col., J. Infect. Diseases, 1998, 178:700). Por tanto, la capacidad de esta proteína para reducir la colonización era inesperada debido a su localización predicha en el citoplasma.

Los estudios químicos indican que la PPP aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* tiene un peso molecular de aproximadamente 20 kDa, determinándose el peso molecular usando un gel de SDS-PAGE al 10-20%. Se determina que la PPP recombinante tiene un punto isoeléctrico de aproximadamente 4,587. Adicionalmente, la proteína tiene una carga de aproximadamente -14,214 a pH de aproximadamente 7.

5 **Streptococcus pneumoniae**

La *S. pneumoniae* es una especie de bacterias que es altamente infecciosa en el cuerpo humano. Hasta la fecha se han identificado más de 80 serotipos. Varios de estos serotipos son agentes etiológicos en una variedad de estados de enfermedad que incluyen, pero no se limitan a, neumonía, meningitis, endocarditis, artritis, sinusitis, otitis, bronquitis y laringitis. Las infecciones neumocócicas se han identificado como una causa principal de muerte en personas con sistemas inmunodeprimidos, tales como aquellos infectados por el VIH.

La *S. pneumoniae* es una especie del género *Streptococcus* de la familia Streptococcaceae. Esta familia comprende células Gram-positivas, inmóviles, esféricas u ovaladas que no forman endoesporas. Las *S. pneumoniae* tienen un aceptor de electrones terminal inorgánico para el metabolismo oxidativo; sin embargo, crecerán en presencia de oxígeno. Esto permite que la *S. pneumoniae* crezca en una variedad de entornos y, por tanto, se adapte bien a crecer en diversos tejidos humanos. La bacteria es difícil de elegir como diana con penicilina ya que muchas cepas producen una cápsula de polisacárido.

La primera etapa hacia la infección neumocócica es la colonización de la nasofaringe. La interrupción de la unión del neumococo a las células nasofaríngeas/óticas humanas produciría la reducción de la colonización y un menor potencial de enfermedad. Por tanto, el aislamiento de las estructuras responsables de la unión neumocócica a células humanas podría conducir a candidatos a vacuna. Los neumococos han desarrollado numerosos mecanismos para unirse a células nasofaríngeas humanas que incluyen las proteínas PspA, PsaA y CbpA. Adicionalmente, los neumococos pueden unirse específicamente a mucina nasofaríngea humana como una primera etapa en la colonización. Por tanto, la identificación de la(s) estructura(s) neumocócica(s) responsable(s) de esta interacción pueden identificar posibles dianas para vacunas.

25 **Biología molecular**

Las realizaciones de la presente invención se refieren a secuencias de polinucleótidos aisladas que codifican los polipéptidos o proteínas, además de variantes de tales secuencias. Preferentemente, bajo condiciones de alta rigurosidad, estas secuencias de variantes se hibridan con polinucleótidos que codifican una o más proteínas neumoprotectoras. Más preferentemente, bajo condiciones de alta rigurosidad, estas secuencias de variantes se hibridan con polinucleótidos que codifican una o más secuencias de proteínas neumoprotectoras tales como la secuencia de polinucleótidos de SEC ID N°: 4. Con los fines de definir condiciones de hibridación de Southern de alta rigurosidad puede hacerse convenientemente referencia a Sambrook y col. (1989) en la pág. 387-389, en la que la etapa de lavado se considera de alta rigurosidad.

La presente invención también se refiere a variantes conservativas en las que la secuencia de polinucleótidos se diferencia de una secuencia de referencia por un cambio en el tercer nucleótido de un triplete de nucleótidos. Preferentemente, estas variantes conservativas funcionan de equivalentes biológicos para la secuencia de polinucleótidos de referencia de PPP1. Variantes que funcionan de equivalentes biológicos son aquellas que se unen a hierro.

La presente invención comprende además secuencias de ADN que, en virtud de la redundancia del código genético, son biológicamente equivalentes a las secuencias que codifican PPP1, es decir, estas otras secuencias de ADN se caracterizan por secuencias de nucleótidos que se diferencian de aquellas expuestas en este documento, pero que codifican una proteína que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la codificada por la secuencia de ADN en SEC ID N°: 4.

La presente invención también comprende secuencias de ADN que codifican secuencias de aminoácidos que se diferencian de las de PPP1 de *S. pneumoniae*, pero que son biológicamente equivalentes a aquellas descritas para esta proteína (SEC ID N°: 5). Puede decirse que tales secuencias de aminoácidos son biológicamente equivalentes a tales de PPP1 si sus secuencias se diferencian sólo en delecciones de, inserciones en o sustituciones menores en la secuencia de PPP1, de forma que las configuraciones terciarias de las secuencias son esencialmente invariables de las de la proteína natural.

Por ejemplo, un codón para el aminoácido alanina, un aminoácido hidrófobo, puede estar sustituido por un codón que codifica otro residuo menos hidrófobo tal como glicina, o un residuo más hidrófobo tal como valina, leucina o isoleucina. Similarmente también puede esperarse que cambios que producen sustitución de un residuo negativamente cargado por otro tal como ácido aspártico por ácido glutámico, o un residuo positivamente cargado por otro tal como lisina por arginina, además de cambios basados en similitudes de residuos en su índice hidropático, produzcan un producto biológicamente equivalente. Tampoco cabría esperar que cambios de nucleótidos que produjeran la alteración de porciones del extremo N o del extremo C de la molécula de proteína alteraran la actividad de la proteína.

Puede usarse el índice hidropático de aminoácidos para conferir función biológica interactiva a un polipéptido como se trata por Kyte y Doolittle (1982), en el que se determinó que ciertos aminoácidos pueden estar sustituidos por otros aminoácidos que tienen índices hidropáticos similares y todavía retener una actividad biológica similar. Alternativamente, la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse basándose en la hidrofilia, particularmente cuando la función biológica deseada en el polipéptido que va generarse esté prevista para uso en realizaciones inmunológicas. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 4.554.101 que establece que la mayor hidrofilia promedio local de un "proteína," como se determina por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, establece una correlación con su inmunogenicidad. Por consiguiente, debe observarse que pueden hacerse sustituciones basándose en la hidrofilia asignada a cada aminoácido. En el uso de tanto el índice de hidrofilia como el índice hidropático, que asigna valores a cada aminoácido, se prefiere introducir sustituciones de aminoácidos en las que estos valores sean ± 2 , prefiriéndose particularmente ± 1 , y estando las sustituciones más preferidas dentro de $\pm 0,5$.

Además, los cambios en regiones variables conocidas son biológicamente equivalentes cuando las configuraciones terciarias de las regiones conservadas son esencialmente invariables de aquellas de PPP1. Una definición alternativa de una secuencia biológicamente equivalentes es una que todavía puede generar una respuesta inmunitaria de reactividad cruzada. En particular, las proteínas pueden modificarse por alargamiento o acortamiento de la inserción correspondiente de la pilina gonocócica, siempre que la proteína modificada pueda todavía generar una respuesta inmunitaria.

Cada una de las modificaciones propuestas está dentro de la habilidad rutinaria en la materia como es la determinación de la retención de actividad estructural y biológica de los productos codificados. Por tanto, cuando se usan los términos "proteína neumoprotectora" o "PPP1" o "PPP" tanto en la memoria descriptiva como en las reivindicaciones se entenderá que engloban todas aquellas modificaciones y variaciones que producen la producción de una proteína biológicamente equivalente.

Las características preferibles de PPP1 descritas en este documento, codificada por las secuencias de nucleótidos de la presente invención, incluyen una o más de las siguientes: (a) que es una proteína de membrana o que es una proteína directamente asociada a una membrana; (b) que puede separarse como una proteína usando un gel de SDS-acrilamida; y (c) que retiene su función biológica de interacción con hierro.

Los fragmentos y secuencias de aminoácidos de variantes y secuencias de nucleótidos de variantes que expresan PPP1 son equivalentes biológicos, es decir, retienen la misma función de la PPP1 natural. Tales secuencias de aminoácidos de variantes están codificadas por secuencias de polinucleótidos de la presente invención. Tales secuencias de aminoácidos de variantes pueden tener aproximadamente del 70% a aproximadamente el 80%, y preferentemente aproximadamente el 90%, de similitud global con la secuencia de aminoácidos de PPP1. En una realización preferida, estas secuencias se muestran en la figura 6 y SEC ID N° 10-19. Las secuencias de nucleótidos de variantes pueden tener de tanto aproximadamente el 70% a aproximadamente el 80% como preferentemente de aproximadamente el 90% de similitud global con las secuencias de nucleótidos que, cuando se transcriben, codifican la secuencia de aminoácidos de PPP1 o una secuencia de aminoácidos de variantes de PPP1. En realizaciones alternativas, la región epitópica de la proteína comprende al menos 20 nucleótidos contiguos u 8 aminoácidos contiguos.

La invención se refiere además a la secuencia consenso global de PPP1. Las secuencias de aminoácidos deducidas de PPP1 de diferentes serotipos de *S. pneumoniae* pueden compararse para determinar las secuencias conservadas. En una realización se comparan 10 serotipos diferentes. La secuencia más conservada puede tener muchos usos tales como, pero no se limitan a, determinar los requisitos mínimos necesarios para la unión a proteína, actividad y/o función. En una realización preferida, la secuencia consenso de PPP1 se representa en la Figura 6 y SEC ID N°: 20.

Las secuencias "aisladas" de la presente invención son secuencias que se producen no naturalmente. Por ejemplo, estas secuencias pueden aislarse de su estado normal dentro del genoma de la bacteria; o las secuencias pueden ser sintéticas, es decir, generarse mediante técnicas recombinantes tales como sistemas de expresión recombinantes muy conocidos, o ser generadas por una máquina.

La invención también proporciona un vehículo de clonación de ADN recombinante que puede expresar una PPP1 que comprende una secuencia de control de la expresión que tiene secuencias promotoras e iniciadoras y una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención localizada 3' con respecto a las secuencias promotoras e iniciadoras. Los vehículos de clonación pueden ser cualquier plásmido o vector de expresión conocido en la técnica que incluyen vectores víricos (véase más adelante). En otro aspecto se proporciona una célula huésped que contiene un vehículo de clonación de ADN recombinante y/o una PPP1 recombinante de la presente invención. Secuencias de control de la expresión, células huésped y vectores de expresión adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen a modo de ejemplo en Sambrook y col. (1989).

Pueden seleccionarse células huésped adecuadas basándose en factores que pueden influir en el rendimiento de proteínas recombinantemente expresadas. Estos factores incluyen, pero no se limitan a, condiciones de crecimiento e inducción, estabilidad de ARNm, uso de codones, eficiencia de traducción y la presencia de terminadores de la transcripción para minimizar la ultralectura del promotor. Tras la selección de células huésped adecuadas, la célula

puede transfectarse con vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención. Las células pueden transfectarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica (véase más adelante).

- 5 Una vez que las células huésped se han transfectado con vectores de expresión de la presente invención, las células se cultivan en condiciones tales que expresen los polipéptidos. Entonces, el polipéptido se aísla de forma sustancialmente libre de componentes contaminantes de células huésped por técnicas que son muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

- 10 Dependiendo de la aplicación de las proteínas recombinantes deseadas, una secuencia de nucleótidos heteróloga puede codificar un cofactor, citocina (tal como una interleucina), un epítipo de linfocitos T colaboradores, un marcador de restricción, adyuvante o una proteína de un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria, hongo o parásito), especialmente proteínas que pueden provocar una respuesta inmunitaria protectora. Puede desearse seleccionar una secuencia heteróloga que codifique una porción inmunogénica de un cofactor, citocina (tal como una interleucina), un epítipo de linfocitos T colaboradores, un marcador de restricción, adyuvante o una proteína de un patógeno microbiano diferente (por ejemplo, virus, bacteria u hongo). Otros tipos de restos de no PPP1 incluyen, pero no se limitan a, aquellos de células cancerosas o células tumorales, alérgenos, péptido amiloide, proteína u otros componentes macromoleculares.

Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los genes heterólogos codifican citocinas tales como interleucina 12 que se seleccionan para mejorar las características profilácticas o terapéuticas de las proteínas recombinantes.

- 20 Ejemplos de tales células cancerosas o células tumorales incluyen, pero no se limitan a, antígeno específico para próstata, antígeno carcinoembrionario, MUC-1, Her2, CA-125 y MAGE-3.

Ejemplos de tales alérgenos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la patente de EE.UU. número 5.830.877 y la solicitud de patente internacional publicada número WO 99/51259 e incluyen polen, venenos de insectos, caspa de animales, esporas fúngicas y fármacos (tales como penicilina). Tales componentes interfieren con la producción de anticuerpos IgE, una causa conocida de reacciones alérgicas.

- 25 La proteína de péptido amiloide (APP) participa en enfermedades referidas de forma tan diversa como enfermedad de Alzheimer, amiloidosis o enfermedad amiloidogénica. El péptido β -amiloide (también denominado en lo sucesivo péptido A β) es un fragmento de 42 aminoácidos de APP que se genera por procesamiento de APP por las enzimas β y γ secretasa, y tiene la siguiente secuencia:

- 30 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala (SEC ID N°: 6).

- En algunos pacientes, el depósito amiloide toma la forma de un péptido A β agregado. Sorprendentemente, ahora se ha encontrado que la administración de péptido A β aislado induce una respuesta inmunitaria contra el componente de péptido A β de un depósito amiloide en un huésped vertebrado (véase la solicitud de patente internacional publicada WO 99/27944). Tales péptidos A β también se han ligado a restos sin relacionar. Por tanto, las secuencias de nucleótidos heterólogas de la presente invención incluyen la expresión de este péptido A β , además de fragmentos del péptido A β y anticuerpos para el péptido A β o fragmentos del mismo. Un fragmento tal del péptido A β es el péptido de 28 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia (como se desvela en la patente de EE.UU. 4.666.829):

- 40 Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys (SEC ID N°: 7).

- La secuencia de nucleótidos heteróloga puede seleccionarse para hacer uso de la vía normal de infección de bacterias neumocócicas que entran en el cuerpo por el tracto respiratorio y pueden infectar una variedad de tejidos y células, por ejemplo, las meninges, sangre y pulmón. El gen heterólogo también puede usarse para proporcionar agentes que se usan para terapia génica o para la elección como diana de células específicas. Como alternativa para simplemente aprovechar las células normales expuestas durante la vía normal de infección neumocócica, el gen heterólogo, o fragmento, puede codificar otra proteína o secuencia de aminoácidos de un patógeno diferente que, cuando se emplea como parte de la proteína recombinante, dirige la proteína recombinante a células o tejido que no están en la ruta normal de infección. De este modo, la proteína se convierte en una herramienta que elige diana para la administración de una variedad más amplia de proteínas extrañas.

- 50 El peso molecular de las proteínas puede determinarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Una lista no limitante de procedimientos incluye gel de SDS-PAGE desnaturizante, cromatografía de exclusión por tamaño e isoelectroenfoque. Las condiciones apropiadas para cada procedimiento (por ejemplo, tiempo de separación, voltaje, corriente y tampones) pueden determinarse según se necesite usando procedimientos definidos en la materia. En una realización preferida, el SDS-PAGE desnaturizante se usa para determinar el peso molecular de las proteínas. Adicionalmente, las condiciones usadas para determinar el peso molecular son preferentemente tiempo de separación de 1 hora a 20 miliamperios y corriente constante.

La detección de las proteínas puede determinarse usando diversos procedimientos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western, tinción con azul de Coomassie, tinción con plata, autorradiografía, sondado fluorescente y fosforescente. En una realización preferida de la presente invención, las proteínas se detectaron por transferencia Western.

- 5 Los términos "proteína neumoprotectora", "PPP1" y "PPP" en la descripción de las realizaciones de la invención, más adelante, incluyen realizaciones que emplean fragmentos, variantes y formas atenuadas de las mismas como sustitución de la PPP1 natural o como adición a la misma, a menos que se especifique de otro modo.

Vectores víricos y no víricos

- 10 Los vectores preferidos, particularmente para ensayos celulares *in vitro* e *in vivo*, son vectores víricos tales como lentivirus, retrovirus, virus del herpes, adenovirus, virus adenoasociados, virus de la variolovacuna, baculovirus, alfavirus y otros virus recombinantes con tropismo celular deseable. Por tanto, un gen que codifica una proteína funcional o mutante o fragmento de dominio de polipéptido de la misma puede introducirse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* usando un vector vírico o mediante introducción directa de ADN. La expresión en tejidos elegidos como diana puede efectuarse eligiendo como diana el vector transgénico para células específicas tales como con un vector vírico o un
- 15 ligando de receptor, o usando un promotor específico de tejidos, o ambos. La administración de genes elegidos como diana se describe en la publicación PCT n° WO 95/28494.

- Los vectores víricos comúnmente usados para elección de diana *in vivo* o *ex vivo* y procedimientos de terapia son vectores basados en ADN y vectores retrovíricos. Los procedimientos para construir y usar vectores víricos se conocen en la técnica (por ejemplo, Miller y Rosman, BioTechniques, 1992, 7:980-990). Preferentemente, los
- 20 vectores víricos son defectuosos en la replicación, es decir, no pueden replicarse autónomamente en la célula diana. Preferentemente, el virus defectuoso en la replicación es un virus mínimo, es decir, sólo retiene las secuencias de su genoma que son necesarias para la encapsulación del genoma para producir partículas víricas.

- Ejemplos de alfavirus incluyen, pero no se limitan a, virus de la encefalitis equina del este (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (EEV), virus Everglades, virus Mucambo, virus Pixuna, virus de la encefalitis equina del oeste (EEO), virus Sindbis, virus de los bosques Semliki, virus Middelburg, virus Chikungunya, virus O'nyong-n
- 25 yong, virus del río Ross, virus del bosque Barmah, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzilgach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu y virus Buggy Creek (patente de EE.UU. n° 6.156.558).

- Los vectores víricos de ADN incluyen un virus de ADN atenuado o defectuoso tal como, pero no se limitan a, virus
- 30 del herpes simple (VHS), virus del papiloma, virus de Epstein Barr (VEB), adenovirus, virus adenoasociados (VAA) y similares. Se prefieren virus defectuosos que carecen completamente o casi de genes víricos. El virus defectuoso no es infeccioso después de la introducción en una célula. El uso de vectores víricos defectuosos permite la administración a células en un área localizada específica, sin interés porque el vector pueda infectar otras células. Por tanto, un tejido específico puede elegirse específicamente como diana. Ejemplos de vectores particulares
- 35 incluyen, pero no se limitan a, un vector del virus 1 del herpes defectuoso (VHS 1) (Kaplit y col., Molec. Cell. Neurosci., 1991, 2:320-330), vector del virus del herpes defectuoso que carece de un gen de glico-proteína L, u otros vectores del virus del herpes defectuoso (publicaciones PCT n° WO 94/21807 y WO 92/05263); un vector de adenovirus atenuado tal como el vector descrito por Stratford-Perricaudet y col. (J. Clin. Invest., 1992, 90:626-630; véase también La Salle y col., Science, 1993, 259:988-990); y un vector de virus adenoasociado defectuoso
- 40 (Samulski y col., J. Virol., 1987, 61:3096-3101; Samulski y col., J. Virol., 1989, 63:3822-3828; Lebkowski y col., Mol. Cell. Biol., 1988, 8:3988-3996).

- Diversas compañías producen vectores víricos comercialmente que incluyen, pero no se limitan a, Avigen, Inc. (Alameda, CA; vectores AAV), Cell Genesys (Foster City, CA; vectores retrovíricos, adenovíricos, VAA y vectores
- 45 lentivíricos), Clontech (vectores retrovíricos y baculovíricos), Genovo, Inc. (Sharon Hill, PA; vectores adenovíricos y VAA), Genvec (vectores adenovíricos), IntroGene (Leiden, Los Países Bajos; vectores adenovíricos), Molecular Medicine (vectores retrovíricos, adenovíricos, VAA y víricos del herpes), Norgen (vectores adenovíricos), Oxford BioMedica (Oxford, Reino Unido; vectores lentivíricos) y Transgene (Estrasburgo, Francia; vectores adenovíricos, de la variolovacuna, retrovíricos y lentivíricos).

- Vectores de adenovirus.* Los adenovirus son virus de ADN eucariota que pueden modificarse para liberar
- 50 eficazmente un ácido nucleico de la invención a una variedad de tipos de células. Existen diversos serotipos de adenovirus. De estos serotipos se da preferencia, dentro del alcance de la presente invención, a usar adenovirus humanos de tipo 2 o tipo 5 (Ad 2 o Ad 5) o adenovirus de origen animal (véase la publicación PCT n° WO 94/26914). Aquellos adenovirus de origen animal que pueden usarse dentro del alcance de la presente invención incluyen adenovirus de origen canino, bovino, murino (ejemplo: Mav1, Beard y col., Virology, 1990, 75-81), ovino, porcino,
- 55 aviar y simio (ejemplo: SAV). Preferentemente, el adenovirus de origen animal es un adenovirus canino, más preferentemente un adenovirus CAV2 (por ejemplo, Manhattan o cepa A26/61, por ejemplo, ATCC VR-800). Se han descrito diversos vectores de adenovirus defectuosos en la replicación y adenovirus mínimos (publicaciones PCT n° WO 94/26914, WO 95/02697, WO 94/28938, WO 94/28152, WO 94/12649, WO 95/02697, WO 96/22378). Los adenovirus recombinantes defectuosos en la replicación según la invención pueden prepararse por cualquier técnica

conocida para el experto en la materia (Levrero y col., Gene, 1991, 101:195; publicación europea nº EP 185 573; Graham, EMBO J., 1984, 3:2917; Graham y col., J. Gen. Virol., 1977, 36:59). Los adenovirus recombinantes se recuperan y se purifican usando técnicas de biología molecular convencionales que son muy conocidas para un experto en la materia.

5 *Virus adenoasociados.* Los virus adenoasociados (VAA) son virus de ADN de tamaño relativamente pequeño que pueden integrarse de un modo estable y específico para sitio en el genoma de las células que infectan. Pueden infectar un amplio espectro de células sin inducir ningún efecto sobre el crecimiento celular, la morfología o la diferenciación, y no parece que participen en patologías humanas. El genoma del VAA se ha clonado, secuenciado y caracterizado. Se ha descrito el uso de vectores derivados de VAA para transferir genes *in vitro* e *in vivo* (véanse las
10 publicaciones PCT nº WO 91/18088 y WO 93/09239; las patentes de EE.UU. nº 4.797.368 y 5.139.941; publicación europea nº EP 488 528). Los VAA recombinantes defectuosos en la replicación según la invención pueden prepararse cotransfectando un plásmido que contiene la secuencia de ácidos nucleicos de interés flanqueada por dos regiones de repetición terminales invertidas (ITR) de VAA y un plásmido que lleva los genes de encapsidación de VAA (genes rep y cap) en una línea celular que está infectada por un virus colaborador humano (por ejemplo, un
15 adenovirus). Entonces, los recombinantes de VAA que se producen se purifican por técnicas convencionales.

Vectores de retrovirus. En otra realización, el gen puede introducirse en un vector retroviral, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.399.346; Mann y col., Cell, 1983, 33:153; las patentes de EE.UU. nº 4.650.764 y 4.980.289; Markowitz y col., J. Virol., 1988, 62:1120; la patente de EE.UU. nº 5.124.263; las
20 publicaciones europeas nº EP 453 242 y EP 178 220; Bernstein y col., Genet. Eng., 1985, 7:235; McCormick, BioTechnology, 1985, 3:689; la publicación PCT nº WO 95/07358; y Kuo y col., Blood, 1993, 82:845. Los retrovirus son virus integrantes que infectan células en división. El genoma del retrovirus incluye dos LTR, una secuencia de encapsidación y tres regiones codificantes (gag, pol y env). En vectores retrovirales recombinantes, los genes *gag*, *pol* y *env* están generalmente deletados, por completo o en parte, y sustituidos con una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga de interés. Estos vectores pueden construirse a partir de diferentes tipos de retrovirus tales como, VIH, MoMuLV ("virus de la leucemia murina de Moloney"); MSV ("virus del sarcoma murino de Moloney"), HaSV ("virus del sarcoma de Harvey"); SNV ("virus de la necrosis del bazo"); RSV ("virus del sarcoma de Rous") y virus de Friend. En la técnica anterior se han descrito líneas celulares de encapsidación adecuadas, en particular la línea celular PA317 (patente de EE.UU. nº 4.861.719); la línea celular PsiCRIP (publicación PCT nº WO 90/02806) y la línea celular GP+envAm-12 (publicación PCT nº WO 89/07150). Además, los vectores retrovirales recombinantes
30 pueden contener modificaciones dentro de las LTR para suprimir la actividad de transcripción, además de secuencias de encapsidación extensivas que pueden incluir una parte del gen gag (Bender y col., J. Virol., 1987, 61:1639). Los vectores retrovirales recombinantes se purifican por técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia.

Los vectores retrovirales pueden construirse para funcionar como partículas infecciosas o para someterse a una
35 única ronda de transfección. En el primer caso, el virus se modifica para retener todos sus genes, excepto aquellos responsables de propiedades de transformación oncogénicas y para expresar el gen heterólogo. Los vectores víricos no infecciosos se manipulan para destruir la señal de encapsidación vírica, pero retienen los genes estructurales requeridos para encapsidar los virus cointroducidos manipulados para contener el gen heterólogo y las señales de encapsidación. Por tanto, las partículas víricas que se producen no pueden producir virus adicionales.

40 Los vectores de retrovirus también pueden introducirse por virus de ADN, que permite un ciclo de replicación retroviral y amplifica la eficiencia de transfección (véanse las publicaciones PCT nº WO 95/22617, WO 95/26411, WO 96/39036 y WO 97/19182).

Vectores de lentivirus. En otra realización, los vectores lentivirales pueden usarse como agentes para la administración directa y la expresión sostenida de un transgén en varios tipos de tejido que incluyen cerebro, retina, músculo, hígado y sangre. Los vectores pueden traducir eficazmente células en división y no en división en estos tejidos y mantener la expresión a largo plazo del gen de interés. Para una revisión véase Naldini, Curr. Opin. Biotechnol., 1998, 9:457-63; véase también Zufferey y col., J. Virol., 1998, 72:9873-80). Las líneas celulares de encapsidación lentivirales están disponibles y generalmente son conocidas en la materia. Facilitan la producción de factores de lentivirus de alto título para la terapia génica. Un ejemplo es una línea celular de encapsidación de
50 lentivirus del pseudotipo VSV-G inducible por tetraciclina que puede generar partículas de virus a títulos mayores de 10⁶ UI/ml durante al menos 3 a 4 días (Kafri y col., J. Virol., 1999, 73: 576-584). El vector producido por la línea celular inducible puede concentrarse según se necesite para traducir eficazmente células no en división *in vitro* e *in vivo*.

Vectores no víricos. En otra realización, el vector puede introducirse *in vivo* por lipofección, como ADN desnudo, o con otros agentes que facilitan la transfección (péptidos, polímeros, etc.). Pueden usarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador (Felgner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1987, 84:7413-7417; Felgner y Ringold, Science, 1989, 337:387-388; véase Mackey y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1988, 85:8027-8031; Ulmer y col., Science, 1993, 259:1745-1748). Compuestos y composiciones de lípidos útiles para la transferencia de ácidos nucleicos se describen en las publicaciones de patente PCT nº WO 95/18863 y WO 96/17823, y en la patente de EE.UU. nº 5.459.127. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas con el fin de elección como diana (véase Mackey y col., anteriormente).

Los péptidos elegidos como diana, por ejemplo, hormonas o neurotransmisores, y proteínas tales como anticuerpos, o moléculas no peptídicas, podrían acoplarse químicamente a liposomas.

También son útiles otras moléculas para facilitar la transfección de un ácido nucleico *in vivo* tales como un oligopéptido catiónico (por ejemplo, publicación de patente PCT n° WO 95/21931), péptidos derivados de proteínas de unión a ADN (por ejemplo, publicación de patente PCT n° WO 96/25508) o un polímero catiónico (por ejemplo, publicación de patente PCT n° WO 95/21931).

También es posible introducir el vector *in vivo* como plásmido de ADN desnudo. Los vectores de ADN desnudo para la terapia génica pueden introducirse en las células huésped deseadas mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, uso de una pistola de genes o uso de un transportador de vectores de ADN (por ejemplo, Wu y col., J. Biol. Chem., 1992, 267:963-967; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 1988, 263:14621-14624; solicitud de patente canadiense n° 2.012.311; Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88:2726-2730). También pueden usarse enfoques de administración de ADN mediada por receptores (Curiel y col., Hum. Gene Ther., 1992, 3:147-154; Wu y Wu, J. Biol. Chem., 1987, 262:4429-4432). Las patentes de EE.UU. n° 5.580.859 y 5.589.466 desvelan la administración de secuencias de ADN exógeno libres de agentes que facilitan la transfección en un mamífero. Recientemente se ha descrito una técnica de transferencia de ADN *in vivo* de alta eficiencia a voltaje relativamente bajo llamada electrotransferencia (Mir y col., C.P. Acad. Sci., 1988, 321:893; publicaciones PCT n° WO 99/01157; WO 99/01158; WO 99/01175).

Sistema de ensayo

La presente invención contempla cualquier sistema de ensayo de células que permita la valoración de actividades funcionales de composiciones y compuestos inmunogénicos que modulan la unión de PPP1 a hierro. En una realización específica, el ensayo puede usarse para identificar compuestos que interactúan con PPP1 para disminuir la unión de PPP1, descrita en este documento, a hierro. Esto puede evaluarse valorando los efectos de un compuesto de prueba sobre la interacción de la proteína descrita en este documento. También puede utilizarse un sistema de ensayo de células que valora la capacidad del compuesto para provocar anticuerpos opsonofagocíticos contra *S. pneumoniae* (Gray, B.M. 1990. Conjugate Vaccines Supplement p694-697).

La presente invención contempla cualquier procedimiento conveniente que permita la detección de la unión de hierro con PPP. En una realización preferida de la invención, los componentes de proteína de *S. pneumoniae* pueden separarse sobre un gel de poliacrilamida y transferirse a un soporte sólido. Entonces, el soporte puede sondarse con un componente que interactúa marcado (por ejemplo, hierro). El componente puede marcarse con cualquier marca conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a, radioactividad, basada en enzimas, moléculas de colorante o una marca fluorescente o fosforescente. En una realización preferida, la marca es radiactiva. La marca puede detectarse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, autorradiografía, contador de centelleo o luz ultravioleta. En una realización preferida, la radiomarca se detecta por autorradiografía. También son conocidos los ensayos que amplifican las señales de la sonda tales como, por ejemplo, aquellos que utilizan biotina y avidina, e inmunoensayos marcados con enzimas tales como ensayos de ELISA.

Procedimientos de cribado in vitro

Se añaden agentes candidatos a los sistemas de ensayo, preparados mediante procedimientos conocidos en la materia, y se mide el nivel de unión entre el hierro y la PPP1. Pueden usarse diversos sistemas *in vitro* para analizar los efectos de un compuesto sobre la unión al hierro. Preferentemente, cada experimento se realiza más de una vez, tal como, por ejemplo, por triplicado a múltiples diluciones de compuesto diferentes.

El sistema de cribado de la invención permite la detección de inhibidores de unión. Un cribado de inhibidores implica detectar la interacción de hierro y PPP1 cuando se ponen en contacto con un compuesto que regula la interacción de estas proteínas. Si se detecta una disminución en la unión de hierro a PPP1, entonces el compuesto es un inhibidor candidato. Si no se observa disminución, el compuesto no altera la unión del hierro a la proteína de la presente invención.

Composiciones inmunogénicas

En otras realizaciones de la presente invención se emplean PPP1 en composiciones inmunogénicas que comprenden (i) al menos una PPP1; (ii) al menos un tampón, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante. En una realización preferida, la composición inmunogénica se usa como vacuna. La PPP1 puede producirse recombinantemente o aislarse de una fabricación bacteriana según procedimientos conocidos en la técnica. Preferentemente, estas composiciones tienen aplicaciones terapéuticas y profilácticas como composiciones inmunogénicas en la prevención, protección y/o la mejora de infección neumocócica. En tales aplicaciones se emplea una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos una PPP1 en cantidad tal que se produzca una reducción, preferentemente una reducción sustancial, en el transcurso de una infección neumocócica normal. Las proteínas pueden ser atenuadas. El término "atenuado" se refiere a proteínas que mantienen su actividad inmunogénica mientras que disminuyen o se delecionan una o varias características funcionales. Por ejemplo, la forma atenuada de esta proteína puede presentar propiedades de unión disminuidas

tales como su capacidad para unirse a hierro. Alternativamente, la forma atenuada puede disminuir la capacidad de *S. pneumoniae* para unirse a hierro.

Como se usa en este documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad del componente inmunógeno (es decir, PPP1) descrito en este documento para estimular una respuesta inmunitaria, es decir, para producir la producción de anticuerpos y/o una respuesta mediada por células cuando se introduce en un sujeto. En una realización preferida, la cantidad eficaz disminuirá la colonización de *S. pneumoniae*. El término “componente inmunógeno” se refiere a la capacidad de este componente para estimular la producción de anticuerpos secretorios y/o de respuestas mediadas por célula en regiones locales, por ejemplo, la nasofaringe, cuando se administra sistémicamente como una composición inmunogénica según la presente invención.

Como se usa en este documento, el término “adyuvante” se refiere a un agente, compuesto o similar que potencia o estimula la respuesta inmunitaria en un sujeto cuando se administra en combinación con la composición inmunogénica. Por tanto, la respuesta inmunitaria provocada por la combinación de composición inmunogénica, como se mide por cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica, será generalmente mayor que la provocada por la composición inmunogénica sola.

Las composiciones de la invención pueden incluir un adyuvante que incluye, pero no se limita a, hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio; Stimulon™ QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); MPL™ (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; Corixa, Seattle, Washington); RC529 (Corixa) y compuestos de aminoalquilglucosaminafosfato como se describen en la solicitud PCT publicada WO 98/50399 (RIBI Immunochem Research); IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, MA); N-acetil-muramyl-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP); N-acetil-nor-muramyl-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637, denominado nor-MDP); N-acetilmuramyl-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835A, denominado MTP-PE); factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y toxina del cólera. Otros que pueden usarse son derivados no tóxicos de la toxina del cólera que incluyen su subunidad B (por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición 29 de aminoácido está sustituido por otro aminoácido, preferentemente una histidina según la solicitud de patente internacional publicada WO 00/18434), y/o conjugados o fusiones genéticamente manipuladas de polipéptidos de no PPP con toxina del cólera o su subunidad B, polisacáridos fúngicos procoleragenoides. El adyuvante puede usarse en su forma natural o puede usarse una versión sintética o semisintética de un adyuvante. Puede usarse cualquier formulación del adyuvante dependiendo de la respuesta deseada y del procedimiento de administración. Pueden usarse diversas formas del adyuvante, por ejemplo, un líquido, polvo o emulsión.

La composición inmunogénica puede administrarse como una única dosis en bolo o como una “serie” de administraciones durante un periodo de tiempo definido (por ejemplo, un año). Si se administra más de un año, tales series de administraciones se denominan “vacunas de refuerzo”. Estas administraciones aumentan los niveles de anticuerpo producidos por la administración previa. El compuesto inmunogénico puede administrarse hasta que se hayan identificado niveles de anticuerpo suficientes en el sujeto de manera que se induzca una respuesta inmunitaria tras la exposición del inmunógeno.

La formulación de tales composiciones inmunogénicas es muy conocida para expertos en este campo. Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender componentes antigénicos adicionales (por ejemplo, polipéptido o fragmento del mismo o ácido nucleico que codifica un antígeno o fragmento del mismo) y, preferentemente incluyen un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen todos y cada uno de los disolventes convencionales, medios de dispersión, cargas, vehículos sólidos, disoluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo que no produce una reacción alérgica u otro efecto no deseado en pacientes a los que se administra. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, por ejemplo, uno o más de agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, dextrosa, glicerina, etanol y similares, además de combinaciones de los mismos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden comprender adicionalmente cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o tampones, que potencian la estabilidad en almacén o eficacia del antígeno. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en composiciones inmunogénicas de la presente invención.

Composiciones

En otras realizaciones de la presente invención se emplean secuencias de ácidos nucleicos, secuencias de aminoácidos, vectores de expresión o células huésped de PPP1 en composiciones que comprenden (i) al menos una proteína PPP1, o ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de una PPP1, o un vector de expresión o célula huésped que expresa tal ácido nucleico y (ii) al menos uno de un tampón, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La PPP1 puede producirse recombinantemente o aislarse de una fabricación bacteriana según procedimientos conocidos en la técnica. Preferentemente, estas composiciones tienen aplicaciones terapéuticas y profilácticas. En tales aplicaciones se emplea una cantidad farmacéuticamente eficaz de al menos una PPP1 en cantidad tal que se produzca una actividad funcional definida. Como se usa en este

documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de la proteína PPP1 descrita en este documento para producir un efecto funcional.

La administración de tales composiciones o composiciones inmunogénicas puede ser por cualquier forma eficaz convencional tal como intranasalmente, parenteralmente, por vía oral, o tópicamente aplicada a la superficie de la mucosa tal como a la superficie intranasal, oral, ocular, pulmonar, vaginal o rectal, tal como por spray de aerosol. Las vías de administración preferidas son parenteral o intranasal.

Las formulaciones orales incluyen aquellos excipientes normalmente empleados como, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares.

- 10 Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden administrarse como el único inmunógeno activo en una composición inmunogénica. Sin embargo, alternativamente, la composición inmunogénica puede incluir otros inmunógenos activos que incluyen otros antígenos inmunológicamente activos de otras especies patogénicas. Preferentemente, las especies patogénicas que proporcionan otros antígenos inmunológicamente activos son patógenos bacterianos, por ejemplo, que participan en infecciones bacterianas. De hecho, el uso terapéutico del
- 15 antígeno de PPP de la invención será preferentemente como un componente de una vacuna multivalente que incluye otros antígenos bacterianos de *S. pneumoniae* u otras bacterias patogénicas. Los otros antígenos inmunológicamente activos pueden ser agentes replicantes o agentes no replicantes. Los agentes replicantes incluyen, por ejemplo, formas atenuadas del virus del sarampión, virus de la rubeola, virus de la varicela zóster (VZV), virus paragripal (VPG) y virus respiratorio sincitial (VRS).
- 20 Uno de los aspectos importantes de la presente invención se refiere a un procedimiento de inducción de respuestas inmunitarias en un mamífero que comprende la etapa de proporcionar a dicho mamífero una composición inmunogénica de la presente invención. La composición inmunogénica es una composición que es inmunogénica en el animal o ser humano tratado de forma que la cantidad inmunológicamente eficaz del (de los) polipéptido(s) contenido(s) en tal composición provoca la respuesta deseada contra la infección neumocócica. Las realizaciones
- 25 preferidas se refieren al uso, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento que incluye mejora o prevención de infección neumocócica en un ser humano, de una cantidad inmunológicamente eficaz de la composición inmunogénica. La cantidad de dosificación puede variar dependiendo de condiciones específicas del individuo. Esta cantidad puede determinarse en ensayos rutinarios por medios conocidos para aquellos expertos en la materia.
- 30 Ciertamente, las secuencias de aminoácidos aisladas para las proteínas de la presente invención pueden usarse en la formación de composiciones inmunogénicas de subunidades. También pueden usarse como antígenos para producir anticuerpos policlonales o monoclonales y en inmunoensayos para la detección de anticuerpos reactivos con proteína anti-PPP1. Los inmunoensayos englobados por la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.367.110 (ensayo sándwich de anticuerpo monoclonal doble) y la
- 35 patente de EE.UU. nº 4.452.901 (transferencia Western). Otros ensayos incluyen inmunoprecipitación de ligandos marcados e inmunocitoquímica, ambos *in vitro* e *in vivo*.

Procedimientos de inducción de una respuesta inmunitaria

Según la presente invención, la colonización de *S. pneumoniae* implica proteínas PPP1. La presente invención proporciona el uso en la fabricación de un medicamento para prevenir infecciones neumocócicas de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica que induce una respuesta inmunitaria en el sujeto. Estos usos incluyen, pero no se limitan a, administración de una composición inmunogénica que comprende al menos una proteína PPP1, variante, fragmento o versión atenuada de la misma, o al menos un vector de expresión que codifica la variante de proteína, fragmento o versión atenuada de la misma.

Procedimientos para inhibir infección neumocócica

- 45 La presente invención proporciona además el uso en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto que está infectado por bacterias neumocócicas de una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición o compuesto que bloquea efectos funcionales asociados a las proteínas PPP1. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, administración de una composición que comprende al menos una proteína PPP1 o fragmentos de la misma o al menos un vector de expresión que codifica una proteína PPP1 o
- 50 administración de un compuesto que bloquea, sustancialmente toda o al menos en parte, una función de las proteínas PPP1.

Procedimientos de diagnóstico

- La presente invención también proporciona un procedimiento de diagnosticar una infección neumocócica o identificar una cepa de composición inmunogénica neumocócica que se ha administrado que comprende la etapa de
- 55 determinar la presencia, en una muestra, de una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº: 5 o cualquiera de 10-19. Puede usarse cualquier procedimiento de diagnóstico convencional. Estos procedimientos de diagnóstico pueden basarse fácilmente en la presencia de una secuencia de aminoácidos o polipéptido. Preferentemente, un

procedimiento de diagnóstico tal ajusta un polipéptido que tiene al menos 10, y preferentemente al menos 20, aminoácidos que son comunes a las secuencias de aminoácidos de la presente invención.

Las secuencias de ácidos nucleicos desveladas en este documento también pueden usarse para una variedad de aplicaciones de diagnóstico. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden usarse para preparar secuencias de ADN y ARN relativamente cortas que tienen la capacidad de hibridarse específicamente con las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína PPP1. Se seleccionan sondas de ácido nucleico para la longitud deseada en vista de los parámetros de especificidad seleccionados del ensayo de diagnóstico. Las sondas pueden usarse en ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de organismos patógenicos, o en la identificación de una composición inmunogénica neumocócica que se ha administrado, en una muestra dada. Con las actuales tecnologías avanzadas para la expresión recombinante, las secuencias de ácidos nucleicos pueden insertarse en un constructo de expresión con el fin de cribar los oligopéptidos y polipéptidos correspondientes para la reactividad con anticuerpos existentes o para la capacidad para generar reactivos de diagnóstico o terapéuticos. Secuencias de control de la expresión y combinaciones de células huésped/vehículos de clonación adecuados son muy conocidos en la técnica y se describen a modo de ejemplo en Sambrook y col. (1989).

En realizaciones preferidas, las secuencias de ácidos nucleicos empleadas para los estudios o ensayos de hibridación incluyen secuencias que son complementarias a un alargamiento de nucleótidos de al menos aproximadamente 10, preferentemente aproximadamente 15, y más preferentemente aproximadamente 20 nucleótidos. Puede emplearse una variedad de técnicas y sistemas de hibridación conocidos para poner en práctica los aspectos de hibridación de la presente invención que incluyen ensayos de diagnóstico tales como aquellos descritos en Falkow y col., patente de EE.UU. 4.358.535. Preferentemente, las secuencias que reconocen o se unen a una secuencia de ácidos nucleicos en la proteína PPP1 son consecutivas.

En general, se prevé que las sondas de hibridación descritas en este documento sean útiles tanto como reactivos en hibridaciones en disolución como en realizaciones empleando una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o ARN) de prueba de muestras clínicas sospechosas, tales como exudados, fluidos corporales (por ejemplo, efusión del oído medio, líquido de lavado broncoalveolar) o incluso tejidos, se absorbe o de otro modo se fija a una matriz o superficie seleccionada. Entonces, este ácido nucleico monocatenario fijo se somete a hibridación específica con sondas seleccionadas bajo condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares basándose en los criterios requeridos particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de la sonda de hibridación). Tras el lavado de la superficie hibridada de manera que se eliminen las moléculas de sonda no específicamente unidas se detecta la hibridación específica, o incluso se cuantifica, por medio de la marca.

Las secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína PPP1 de la invención, o sus variantes, pueden ser útiles conjuntamente con tecnología de PCR* como se explica, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 4.603.102. Pueden utilizarse diversas porciones de cualquiera de las secuencias de proteínas PPP1 de la presente invención como sondas de oligonucleótidos para la amplificación de PCR* de una porción definida de un gen de PPP1, o nucleótido, secuencia que luego puede detectarse por hibridación con una sonda de hibridación que contiene una secuencia complementaria. De este modo pueden detectarse concentraciones extremadamente pequeñas de la secuencia de ácidos nucleicos de PPP1 en una muestra utilizando las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

Los siguientes ejemplos están incluidos para ilustrar ciertas realizaciones de la invención.

Anticuerpos

La presente invención describe anticuerpos que pueden usarse para detectar la presencia de proteínas PPP1 presentes en muestras. Adicionalmente, los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo antiidiotípicos) pueden usarse para inhibir respuestas inmunitarias a infecciones neumocócicas.

Según la invención, los polipéptidos de la proteína PPP1 producidos recombinantemente o por síntesis química, y fragmentos u otros derivados, pueden usarse como inmunógeno para generar anticuerpos que reconocen el polipéptido o porciones del mismo. La porción del polipéptido usada como inmunógeno puede seleccionarse específicamente para modular la inmunogenicidad del anticuerpo desarrollado. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlonales, monoclonales, humanizados, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab, y una biblioteca de expresión de Fab. Un anticuerpo que es específico para la proteína PPP1 humana puede reconocer una forma natural o mutante de las proteínas PPP1. En una realización específica, el anticuerpo comprende al menos 8 aminoácidos, preferentemente 8-10 aminoácidos, y más preferentemente 15-30 aminoácidos. Preferentemente, el anticuerpo reconoce o se une a aminoácidos en PPP1 que son consecutivos.

Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales para polipéptidos, derivados o análogos. Para la producción del anticuerpo pueden inmunizarse diversos animales huésped que incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, oveja, cabras, etc., mediante inyección con el polipéptido o un derivado (por ejemplo, fragmento o proteína de fusión). El polipéptido o fragmento del mismo puede conjugarse con un vehículo inmunogénico, por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa

californiana (KLH). Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huésped, que incluyen, pero no se limitan a, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, KLH, dinitrofenol y adyuvantes humanos posiblemente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína PPP1, fragmento, análogo, o derivado de la misma pueden prepararse por cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Éstas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (Nature 256:495-497, 1975), además de la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos (Kozbor y col., Immunology Today 4:72, 1983; Cote y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:2026-2030, 1983) y la técnica de hibridomas de VEB para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96, 1985). Los "anticuerpos quiméricos" pueden producirse (Morrison y col., J. Bacteriol. 159:870, 1984; Neuberger y col., Nature 312:604-608, 1984; Takeda y col., Nature 314:452-454, 1985) cortando y empalmando los genes de una molécula de anticuerpo no humano específico para un polipéptido junto con los genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada.

En la producción y el uso de anticuerpos, el cribado o la prueba con el anticuerpo deseado puede llevarse a cabo por técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, radioinmunoensayo, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ* (usando, por ejemplo, oro coloidal, marcas de enzimas o radioisótopos), transferencias Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación (por ejemplo, ensayos de aglutinación en gel, ensayos de hemaglutinación), ensayos de fijación del complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A y ensayos de inmunoelectroforesis, etc.

Los anteriores anticuerpos pueden usarse en procedimientos conocidos en la técnica referentes a la localización y actividad del polipéptido, por ejemplo, para transferencia Western, obtención de imágenes del polipéptido *in situ*, medición de niveles del mismo en muestras fisiológicas apropiadas, etc. usando cualquiera de las técnicas de detección anteriormente mencionadas o conocidas en la técnica. Tales anticuerpos también pueden usarse en ensayos para la unión a ligando, por ejemplo, como se describen en la patente de EE.UU. n° 5.679.582. La unión a anticuerpos se produce generalmente de la forma más fácil bajo condiciones fisiológicas, por ejemplo, pH de entre aproximadamente 7 y 8, y fuerza iónica fisiológica. La presencia de una proteína portadora en las disoluciones de tampón estabiliza los ensayos. Mientras que haya cierta tolerancia de perturbación de condiciones óptimas, por ejemplo, aumento o disminución de la fuerza iónica, o pH, o adición de detergentes o sales caotrópicas, tales perturbaciones disminuirán la estabilidad de unión.

En una realización específica pueden generarse anticuerpos que agonizan la actividad de la proteína PPP1. En particular, pueden usarse anticuerpos Fv monocatenarios intracelulares para regular la proteína PPP1. Tales anticuerpos pueden probarse usando los ensayos descritos más adelante para identificar ligandos.

En otra realización específica, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos antiidiotípicos. Estos anticuerpos reconocen y o se unen a otros anticuerpos presentes en el sistema. Los anticuerpos antiidiotípicos pueden ser monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados.

En otra realización específica, los anticuerpos de la presente invención están conjugados con un componente secundario tal como, por ejemplo, una molécula pequeña, polipéptido o polinucleótido. La conjugación puede producirse mediante una modificación química del anticuerpo, que conjuga el anticuerpo con el componente secundario. El anticuerpo conjugado permitirá elegir como diana el componente secundario tal como, por ejemplo, un antibiótico para el sitio de interés. El componente secundario puede ser de cualquier tamaño o longitud. En una realización específica, el componente secundario es un compuesto farmacéuticamente activo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de anticuerpos como se ha tratado anteriormente para elegir como diana un compuesto farmacéutico. En esta realización, los anticuerpos contra la proteína PPP1 se usan para presentar compuestos específicos para sitios infectados. Los compuestos, preferentemente un agente antibiótico, cuando se conjugan con los anticuerpos, se denominan compuestos elegidos como diana o agentes elegidos como diana. Procedimientos para generar tales compuestos y agentes diana se conocen en la técnica. Publicaciones a modo de ejemplo sobre compuestos diana y su fabricación se exponen en las patentes de EE.UU. n° 5.053.934; 5.773.001; y 6.015.562.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Cepas y plásmidos bacterianos

Las cepas de *S. pneumoniae* utilizadas en este trabajo fueron CP1200 de *S. pneumoniae*, un derivado de R36A altamente transformable no encapsulado, una variante rugosa de D39, una cepa virulenta de tipo 2 (Morrison, D.A. y

col., J. Bacteriology, 1983, 156:281) obtenida de Margaret Hostetter de la Universidad de Yale, CT., y la cepa 49136 de *S. pneumoniae* obtenida de la ATCC. La *S. pneumoniae* se cultivó hasta la fase logarítmica (aprox. D.O. de 0,6-0,8 a 600 nm) en medio Todd Hewitt (Difco Lab., Detroit, MI) con extracto de levadura al 0,5% (Difco) a 37°C con aireación o en placas de agar de soja triptica (Difco) con sangre. Las cepas de *Escherichia coli* usadas en este estudio fueron BL21 (DE3), BLR (DE3) (Novagen, Madison, WI), Top10F' (Invitrogen, San Diego, CA), y se cultivaron en medio SOB (15) a 37°C con aireación conteniendo antibióticos apropiados. Los plásmidos usados en este trabajo fueron PCR2.1 TOPO (Invitrogen) y pET28a (Novagen). Cuando se especifique se usó cloranfenicol a 20 µg/ml, ampicilina a 100 µg/ml, estreptomycin a 100 µg/ml y kanamicina a 25 µg/ml. Las enzimas de restricción se compraron de New England Biolabs (Beverly, MA) y se usaron según las indicaciones del fabricante.

10 **Identificación de una proteína asociada a la superficie en fracciones de la membrana externa de *S. pneumoniae***

Extracción de componentes asociados a la superficie - Se cultivaron bacterias en 4 litros de caldo Todd Hewitt y se recogieron por centrifugación a 8000 x g durante 30 minutos. El sedimento se suspendió en ~175 ml de PBS con la ayuda de una pipeta y se centrifugó inmediatamente a 20000 x g durante 30 min. El lavado se filtró a través de un filtro de 0,45 µm (Nalgene, Rochester, NY), se dializó y se liofilizó.

Cromatografía de intercambio iónico de componentes asociados a la superficie de proteína - El extracto de PBS de *S. pneumoniae* se disolvió en Tris-HCl, pH 7,6 (10 mM, 100 ml) y se sometió a cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-Sepharose CL-6B. Después de lavar la columna con el tampón de muestra se eluyó primero con Tris-HCl 200 mM, pH 7,6, seguido de un gradiente de NaCl lineal hasta una concentración de NaCl final de 0,75 M (en Tris-HCl 200 mM, pH 7,6) durante 300 ml. Las fracciones de columna se analizaron por gel de SDS-PAGE. Las fracciones que contenían una cantidad sustancial de una proteína asociada a la superficie de aproximadamente 18-20 kDa se reunieron, se desalaron mediante el concentrador Centricon SR3 y se liofilizaron.

Análisis de la secuencia de aminoácidos del extremo N por escisión de transferencia en PVDF.

La muestra se diluyó a 1 mg/ml de proteína total y se combinó 1:1 con 2X tampón de carga de muestra Tris-SDS-β-ME (Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, SDS al 2%, β-mercaptoetanol al 10%, glicerina al 30%, azul de bromofenol al 0,01%) (Owl Separation, Portsmouth, NH) y se calentó a 100°C durante 5 minutos. Se cargaron aproximadamente 10 µg de proteína total (20 µl de disolución calentada) de muestra en cada una de diez hileras sobre un gel de acrilamida/bis-acrilamida al 10-20% de gradiente de 12 hileras, 10 cm x 10 cm x 1 mm (Zaxis, Hudson, OH). Los marcadores de peso molecular (Novex, San Diego, CA) se cargaron en las dos hileras más externas de cada lado del gel. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Owl Separations Mini-Gel a un amperaje constante de 50 mA durante 1 hora en tampón de ejecución Tris-glicina-SDS de Bio-Rad. Entonces, el gel se aclaró con agua desionizada y se transfirió a PVDF (poli(fluoruro de vinilideno) Millipore Immobilon-P usando un sistema de transferencia semiseco suministrado por Owl Separations a amperaje constante de 150 mA durante 1 hora. La transferencia resultante se tiñó con Amido Black (ácido acético al 10%, Amido Black al 0,1% en agua desionizada) y se destiñó en ácido acético al 10%. Entonces, la banda de proteínas se suprimió de las diez hileras usando un escalpelo limpiado con metanol o cuchilla Mini-Exacto y se colocó en el cartucho de reacción del secuenciador de proteínas Applied Biosystems 477A (Foster City, CA). Entonces, el secuenciador del extremo N se ejecutó bajo condiciones de transferencia óptimas durante 12 o más ciclos (1 ciclo de blanco, 1 ciclo de patrón y 10 o más ciclos para la identificación de residuos deseados). La detección del PTH-aminoácido se hizo en el analizador Applied Biosystems 120A PTH. Los ciclos se recogieron tanto en un registrador gráfico analógico como digitalmente mediante el software del instrumento. La asignación de aminoácidos del extremo N se realizó mediante comparación de los datos analógicos y digitales con un conjunto patrón de PTH-aminoácidos y sus tiempos de retención respectivos en el analizador (los residuos de cisteína se destruyen durante la conversión y no se detectan).

Subclonación y expresión de las proteínas recombinantes asociadas a la superficie de 20 kDa

Se compararon las secuencias del extremo N frente a la base de datos no redundante NCBI localizada en www.ncbi.nlm.org usando el algoritmo BLAST desarrollado por Altschul (Altschul, SF y col., J. Mol-Biol., 1990, 215:403). Entonces, esto mostró que la secuencia del extremo N tenía identidad con un marco de lectura abierto (ORF) en la base de datos NCBI. Este ORF se había secuenciado previamente y se enumeró como ORF no identificado (Pikis, A. y col., J. Infect. Dis., 1998,178:700). El posterior análisis con BLAST del ORF desconocido frente a la versión pública del genoma de *S. pneumoniae* (serotipo 4), puesto a disposición por el Instituto de investigación genómica (TIGR, www.tigr.org), mostró que el ORF estaba presente en el genoma, pero tampoco se identificó. Los análisis de ADN del ORF desconocido en la secuencia genómica de *S. pneumoniae* y los diseños de cebadores se realizaron usando el software de análisis de ADN y proteínas Lasergene de DNASTAR (Madison, WI).

Se diseñaron cebadores que flanqueaban el ORF (SEC ID N°: 1 y 2) y posteriormente se sintetizaron usando el sintetizador de ADN AB1380A. Para facilitar la subclonación del producto de PCR en el vector de expresión pET28a se diseñaron sitios de restricción en los cebadores de PCR. Se incluyó un sitio Nco 1 en el cebador 5', que permitió tanto la ligación en el sitio Nco 1 del vector de expresión como también incluyó un codón de iniciación ATG. Para mantener el marco de lectura correcto se incluyeron dos bases adicionales en el cebador 5', produciendo la adición de un codón para leucina. Se incluyó un sitio Sal1 en el cebador 3'.

Se generó un fragmento de PCR del tamaño esperado a partir de CP1200, ligado en el vector pCR2.1, y se usó para transformar células OneShot Top 10F' (Invitrogen). Se cribaron transformantes resistentes a ampicilina por digestión con restricción de ADN de plásmido preparado por lisis alcalina (Birnboim, H.C. y Duly, J., Nuc. Acid Res., 1978 7:1513). Se identificó un plásmido recombinante que contenía el gen de 20 kDa. La secuencia de ADN se obtuvo de los clones usando Applied Biosystems Prism Dye Terminator Cycle-Sequencing Core Kit en el protocolo de Prism suministrado por el vendedor. Se usaron aproximadamente 1 ug de ADN mensajero y 100 ng de cebador para cada reacción de ciclado. Las reacciones se ciclaron en la unidad GeneAmp PCR Systems 2400, se purificaron usando el procedimiento de Prism y se analizaron en un secuenciador de ADN ABI 373A (Applied Biosystems).

El inserto que contenía el gen de r20 kDa se escindió por digestión con restricción con Nco1 y Sal1, y se separó en un gel de agarosa al 1,5%. El fragmento de ADN se cortó del gel y se purificó de la agarosa mediante un kit Bio 101 Spin (Vista, CA). El inserto se ligó con el ADN de vector de plásmido (pET28a) también digerido con Nco1 y Sal1, y posteriormente se transformó en células Top10F' (Invitrogen). Los transformantes resistentes a kanamicina se cribaron por digestión con restricción de ADN de plásmido preparado por lisis alcalina (Birnboim, H.C. y Duly J., Nuc. Acid Res., 1978 7:1513). Un plásmido recombinante se transformó posteriormente en células BL21 (Novagen) para crear pLP533 y se cultivó en medio SOB complementado con 30 ug/ml de kanamicina. Las células se cultivaron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,6, y posteriormente se indujeron con IPTG 0,4 mM (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) durante 2-4 horas. Se prepararon lisados celulares completos y se sometieron a electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 15% (Laemmli, U.K., Nature, 1970, 227:680) para confirmar la expresión del producto recombinante deseado.

Purificación de la proteína recombinante asociada a la superficie de 20 kDa.

Un matraz de 250 ml que contenía 50 ml de medio SOB, complementado con 30 µg/ml de kanamicina (Sigma, St. Louis, MO), se inoculó con un raspado de un cultivo congelado de pLP533 de *E. coli*. El cultivo se incubó a 37°C agitando a 200 rpm durante aproximadamente 16 horas. Posteriormente se inocularon dos matraces de 1 litro que contenían SOB más 30 ug/ml de kanamicina con 20 ml del cultivo durante la noche y se incubaron a 37°C agitando a 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de DO₆₀₀ de 0,7 - 0,8 se añadió IPTG (Gold Biotechnology, St. Louis, MO) a 0,8 mM. El cultivo se incubó a la misma temperatura agitando durante tres horas adicionales. Entonces, las células se recogieron por centrifugación durante 15 min a 7300 x g. Los sedimentos de células se congelaron a -20°C y luego se descongelaron y se resuspendieron en 300 ml de fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0 (J.T. Baker, Phillipsburg, PA). Entonces, la suspensión de células se pasó por un microfluidizador (Microfluidics Corporation, Newton, MA) para lisar las células. El lisado se centrifugó durante 15 min a 16.000 x g y el sobrenadante resultante se centrifugó entonces durante 45 min a 200.000 x g. Los sobrenadantes y los sedimentos se ensayaron en cada etapa por SDS-PAGE. El sobrenadante se diluyó hasta 500 ml en fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0. Entonces, la disolución se diafiltró con una membrana de corte de 100.000 MW (Millipore, Bedford, MA) contra 1 l del mismo tampón y se concentró 2,5 veces. La proteína, en el concentrado, se cargó sobre una columna de hidroxiapatita de cerámica de 70 ml (Bio-Rad Laboratories Hercules, CA) en fosfato de sodio 10 mM a pH 6,0. Entonces, la columna se lavó con 10 volúmenes de columna (VC) del tampón de carga. Las proteínas contaminantes se eliminaron lavando la columna con 10 VC de fosfato de sodio 108 mM a pH 6,0. La proteína se eluyó de la columna con un gradiente lineal durante 10 VC de fosfato de sodio 108 mM a 500 mM a pH 6,0. Las fracciones de pico se ejecutaron en un gel de SDS-PAGE al 10% - 20% (Zaxis, Hudson, OH). Las fracciones que contenían la proteína se reunieron y se guardaron a -20°C. La proteína se analizó para su homogeneidad por SDS-PAGE, y la concentración de proteína durante la purificación se determinó mediante el procedimiento de Lowry (Lowry, O.H. y col., S. Biol. Chem., 1951, 198:265). Las concentraciones de proteína antes de la inmunización se determinaron usando un kit BCA obtenido de Pierce Chemicals (Northbrook, IL) y se usó según las indicaciones del

fabricante. Se usó BSA como patrón de proteína.

Antisueros policlonales para el análisis de transferencia Western.

Se usó proteína recombinante para generar antisueros policlonales en ratones. Brevemente, 10 µg de proteína de r20 kDa se complementaron para cada dosis como una emulsión con adyuvante de Freund incompleto (IFA) (1:1 v/v) y se inyectaron subcutáneamente en ratones Swiss Webster de 6-8 semanas de edad. Los ratones se sangraron y se vacunaron a la semana 0, se reforzaron a la semana 4, luego se exanguinaron a la semana 6. Se vacunaron diez ratones con la proteína de r20 kDa complementada con IFA. Los sueros se reunieron y se usaron para análisis adicionales.

SDS-PAGE y transferencia Western.

Se prepararon lisados celulares completos centrifugando números equivalentes de células neumocócicas basándose en la DO_{600} en una microcentrífuga durante 30 s. Se resuspendieron sedimentos neumocócicos de células en un volumen apropiado de tampón de carga. Cuando se indicó, las muestras se hirvieron durante 5 min y se separaron en un gel de SDS-PAGE al 10% usando el procedimiento de Laemmli (Laemmli, Nature, 1970; 227:680). Las muestras se transfirieron a nitrocelulosa (BioRad, Hercules, CA) usando una celda Biorad Mini Transblot (Biorad) y las transferencias se bloquearon a temperatura ambiente durante 30 minutos en leche desnatada al 5%-PBS (BLOTTO). Se usaron antisueros de ratón reunidos a una dilución 1:1000 en BLOTTO durante 60 minutos seguido de lavados de 25 minutos en PBS-Tween 80 al 0,2%. Se usó anticuerpo de cabra dirigido contra IgG+M de ratón conjugada con fosfatasa alcalina (Biosource International, Camarillo, CA) para detectar los anticuerpos unidos a una dilución 1:1000 en BLOTTO. Las transferencias se lavaron como se describe previamente y se detectaron con NBT y BCIP de BioRad según las indicaciones del fabricante.

Inmunización intranasal de ratones antes de la exposición.

Se compraron ratones Balb/c libres de patógenos de seis semanas de edad de Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine) y se alojaron en jaulas bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación estándar. Los ratones BALB/C, a 10 animales por grupo, se inmunizaron con 5 µg de proteína de r20 kDa en las semanas 0, 2 y 4. En casa ocasión se instilaron lentamente 5 µg de r20kDa formulada con 0,1 µg de CT-E29H, una toxina del cólera genéticamente modificada que tiene actividad enzimática y toxicidad reducidas (Tebbey, P:W. y col., Vaccine, 2000, 18:2723) en el orificio nasal de cada ratón en un volumen de 10 µl. Como controles se usaron ratones inmunizados con hemocianina de lapa californiana (KLH)-CT-E29H. Las muestras de suero se recogieron 4 días después de la última inmunización.

Modelo de exposición intranasal de ratón.

Se expusieron ratones Balb/c en la semana 4 día 6 a 1×10^5 UFC de *S. pneumoniae* resistente a estreptomicina de serotipo 3. Los neumococos se inocularon en 3 ml de caldo Todd-Hewitt que contenía 100 µg/ml de estreptomicina. El cultivo se cultivó a 37°C hasta la fase semilogarítmica, luego se diluyó hasta la concentración deseada con caldo Todd-Hewitt y se guardó sobre hielo hasta uso. Cada ratón se anestesió con 1,2 mg de ketamina-HCl (Fort Dodge Laboratory, Ft. Dodge, Iowa) por inyección i.p. La suspensión bacteriana se inoculó a la fosa nasal de ratones anestesiados (10 µl por ratón). La dosis de bacterias real administrada se confirmó por recuento de placas. Cuatro días después de la exposición, los ratones se sacrificaron, se extirparon las fosas nasales y se homogeneizaron en 3 ml de solución salina estéril con un homogeneizador de tejidos (Ultra-Turax T25, Janke & Kunkel Ika-Labortechnik, Staufen, Alemania). El homogeneizado se diluyó 10 veces seriadamente en solución salina y se sembró en placas TSA que contenían estreptomicina. En el mismo tipo de placas también se sembraron cincuenta µl de sangre recogidos 2 días después de la exposición de cada ratón. Las placas se incubaron durante la noche a 37°C y luego se contaron las colonias.

Ensayo de ELISA para proteína de r20 kDa.

Los títulos de anticuerpos contra proteína de r20 kDa se determinaron por enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Los ELISA se realizaron usando r20 kDa (100 µl por pocillo de una disolución madre de 5 µg/ml en PBS, pH 7,1) para recubrir placas Nunc-Immuno™ PolySorp. Las placas se recubrieron durante la noche a 4°C. Después de bloquearse con 200 µl de PBS que contenía leche en polvo desnatada al 5% (tampón de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente, las placas se incubaron con diluciones seriadas de sueros de prueba diluidos en tampón de bloqueo durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Entonces, las placas se lavaron cinco veces con PBS que contenía Tween al 0,1% (PBS-T) y se incubaron con anticuerpo biotinilado de cabra dirigido contra IgG o IgA de ratón (1:8000 ó 1:4000 en PBS; Brookwood Biomedical, Birmingham, AL) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de cinco lavados adicionales con PBS-T, las placas se incubaron con peroxidasa de rábano picante conjugada con estreptavidina (1:10.000 en PBS; Zymed Laboratory Inc., San Francisco, CA) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, las placas se lavaron cinco veces con PBS-T, se incubaron 20 minutos con 100 µl de sustrato ABTS (KPL, Gaithersburg, MD), seguido de la adición de 100 µl de disolución de parada (SDS al 1%). Los valores de absorbancia se leyeron a 405 nm usando un lector de microplacas VERSAmax (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Los títulos del punto final de sueros de prueba fueron los recíprocos de la mayor dilución media que resultó de una lectura de DO_{405} de 0,1. Los títulos de fondo medios de los sueros de prueba se

cuantificaron por valores de absorbancia leídos a 405 nm en los pocillos que tenían todos los reactivos, excepto los sueros.

Procedimientos estadísticos. La comparación de la colonización nasal entre grupos se realizó usando la prueba de Tukey-Kramer (Ludbrook, J., Clin Exp Pharmacol Physiol., 1998, 25:1032). Los resultados se consideraron significativos a $p < 0,05$.

Heterogeneidad de secuencias de PPP1.

Para examinar la heterogeneidad de secuencias para la proteína PPP1, la secuencia de nucleótidos para el gen se comparó entre 10 serotipos diferentes. Se preparó ADN genómico a partir de cultivos durante la noche de cada serotipo de *S. pneumoniae*. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C y se resuspendieron en 2 ml de tampón TE. Las células se lisaron mediante la adición de SDS al 0,3% y proteinasa K (Sigma) a 10 µg/ml. Las células se incubaron durante la noche a 55°C. Las proteínas se extrajeron del lisado aclarado mediante la adición de un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (preparado combinando una mezcla 24:1 de cloroformo/alcohol isoamílico con un volumen igual de fenol saturado con agua). Las fases se separaron por centrifugación a 7500 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente, la fase acuosa se sacó luego a un tubo nuevo. El procedimiento se repitió, entonces el ADN se precipitó de la fase acuosa mediante la adición de NH₄Ac 10,4 M al 20% y 2,5 volúmenes de etanol. El ADN genómico se bobinó usando una varilla de vidrio y se resuspendió en 200 µl de tampón TE. El gen para PPP1 se secuenció a partir del ADN genómico de los serotipos 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 14, 18, 23F y CP1200, usando Applied Biosystems Prism Dye Terminator Cycle-Sequencing Core Kit basado en el protocolo de Prism suministrado por el vendedor. Se usaron aproximadamente 1 µg de ADN mensajero y 100 ng de cebadores para cada reacción de ciclado. Las reacciones se ciclaron en la unidad Gene Amp PCR Systems 2400, se purificaron usando el procedimiento de Prism y se analizaron en un secuenciador de ADN ABI 373A (Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos y sus secuencias de aminoácidos predichas se alinearon en la aplicación Megalign del paquete DNA Lasergene de DNASTar usando el algoritmo Clustal W.

Evaluación del mensajero de PPP1 expresado *in vivo*.

Fabricación de ARN a partir de células cultivadas in vitro

Se cultivaron diversos serotipos de *S. pneumoniae* hasta la fase logarítmica (D.O.₅₅₀ aprox. 0,3) en 60 ml de THB-YE al 0,5% a 37°C con 5% de CO₂. Las células se recogieron por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron posteriormente en 1 ml de ARNasa (Ambion, CA) y se guardaron durante >1 h a 4°C. Entonces, las células se centrifugaron en una microcentrífuga durante 5 minutos a 8000 x g. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 100 µl de desoxicolato al 10% (DOC). Entonces se añadieron 1100 µl de RNAZOL B (Tel-Test, Inc) y la suspensión se mezcló brevemente mediante inversión. Entonces se añadieron 120 µl de CHCl₃, la muestra se mezcló por inversión y luego se centrifugó en una microcentrífuga a toda velocidad durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se eliminó y el ARN se precipitó mediante la adición de un volumen igual de 2-propanol. El ARN se incubó a 4°C durante > 1 h y luego se centrifugó en una microcentrífuga a toda velocidad durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se aspiró y el ARN se lavó con etanol al 75% y se recentrifugó durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el ARN se resuspendió en 50-100 µl de agua libre de nucleasa. El ADN se eliminó del ARN tratando la muestra con ADNasa libre de ARNasa (DNA FREE, Ambion) durante 20 minutos a 37 grados, seguido de la inactivación de la enzima mediante la adición del quelante DNA FREE. La pureza y el rendimiento del ARN se evaluaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm.

Fabricación de ARN a partir de células cultivadas in vivo

Se prepararon células de *S. pneumoniae* de fase logarítmica como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron a 10⁶ ufc/ml en medio RPMI (Celltech) complementado con glucosa al 0,4%. Se selló 1 ml de la suspensión de células en una membrana de diálisis de PVDF con un corte de 80.000 MW (SpectraPor). Dos de tales bolsas se implantaron intraperitonealmente en ratas Sprague Dawley de 400 g. Las bolsas permanecieron en las ratas durante 22 horas, después de lo cual las ratas se sacrificaron y las bolsas se recogieron. Se preparó ARN a partir de las células crecidas intraperitonealmente como se ha descrito anteriormente.

RT-PCR para examinar el mensajero para PPP1 in vivo

El mensajero para el gen de PPP1 se amplificó a partir de tanto ARN preparado a partir de células cultivadas *in vitro* como *in vivo* usando RT-PCR. Se usó un cebador de PCR inversa correspondiente al extremo 3' del gen para generar ADNc bicatenario en la siguiente reacción. Se incubó 1 µg de ARN con 0,25 µM del cebador inverso: GGG GTC GAC TAA ACC AGG TGC TTG TCC AAG TTC (SEC ID N°: 8) durante 3 minutos a 75°C, luego se enfrió hasta 44°C. El mensajero se transcribió inversamente usando el kit RETROscript (Ambion) según las indicaciones del fabricante. Se usó ReddyMix (ABgene) según las indicaciones del fabricante para amplificar el mensajero de PPP1 a partir de 2-5 µl de la muestra usando 0,25 µM del cebador inverso anterior y el cebador directo: GGG GCC ATG GCT GTA GAA TTG AAA AAA GAA (SEC ID N°: 9). 10 µl del producto amplificado se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Resultados

Identificación de la proteína asociada a la superficie de 20 kDa - Se usó un lavado de PBS y cromatografía de intercambio iónico para identificar un componente asociado a la superficie de 20 kDa de *S. pneumoniae* (Figura 1). La hilera 2-9 en la Figura 1 representa la fracción nº 8-16 de una columna de DEAE. Claramente hay una banda de proteínas principal entre 15 y 20 kDa. La banda de bajo peso molecular se resolvió en un gel de SDS-PAGE preparativo y se transfirió a una membrana de PVDF. La membrana de PVDF tiene una capacidad de unión que aumenta el rendimiento de recuperación y secuenciación de muestras, permitiendo una determinación eficaz de los residuos del extremo amino. La secuencia del extremo amino (SEC ID N°: 3) de esta proteína permitió la identificación de un marco de lectura abierto correspondiente en el genoma de *S. pneumoniae* (SEC ID N°: 4 y 5). Este ORF mostró similitud con proteínas de ferritina que contienen hierro no hemo similares en otros organismos, que puede indicar función similar en *S. pneumoniae* (Pikis, A. y col., J. Infectious Diseases, 1998, 178:700). Sin embargo, la función exacta y la localización celular de las proteínas en *S. pneumoniae* son desconocidas. La subclonación y la expresión de este ORF proporcionaron material recombinante del tamaño esperado (Figura 2).

Purificación de la proteína recombinante asociada a la superficie de 20 kDa. La purificación se ayudó de la solubilidad de la proteína recombinante. La purificación significativa de las membranas celulares se logró mediante centrifugaciones secuenciales. Además, la característica de formación de oligómeros se utilizó satisfactoriamente para eliminar las restantes proteínas contaminantes de bajo peso molecular mediante diafiltración. La carga predicha de la proteína a pH neutro permitió que la proteína se purificara a más del 90% de homogeneidad en una columna de hidroxipatita como se observa en la Figura 5.

Reactividad de antiseros para la proteína asociada a la superficie de r20 kDa. Se generaron antiseros policlonales para proteína recombinante asociada a la superficie de 20 kDa en ratones Swiss Webster para evaluar la conservación antigénica de la proteína entre cepas. Los antiseros para la proteína de r20 kDa reaccionaron con proteínas de aproximadamente 20, 40 y 80 kDa en lisados celulares completos sin calentar de especies nativas (Figura 3), mientras que la principal especie reactiva observada en muestras calentadas tenía aproximadamente 20 kDa (no mostrada). Estos resultados sugieren que esta proteína es parte de un complejo de 4 subunidades o más.

Reto intranasal. Para determinar si la inmunización i.n. con proteína asociada a la superficie de r20 kDa puede inducir respuestas inmunitarias en suero, ratones Balb/c se administraron con 5 µg de r20 kDa 3 veces a intervalos de cada dos semanas usando CT-E29H (0,1 µg/dosis) como adyuvante de la mucosa. Los inmunoseros recogidos 4 días después de la última inmunización de refuerzo se probaron en los ensayos de ELISA específicos para antígeno. 4 días después de la última inmunización de refuerzo se generaron fuertes respuestas de anticuerpos IgG e IgA específicos para antígeno en ratones inmunizados con r20 kDa-E29H (Tabla 6). Cuando se comparó con la proteína KLH sin relacionar, la inmunización con la proteína asociada a la superficie de r20 kDa pudo reducir significativamente la colonización de *S. pneumoniae* de tipo 3 de la nasofaringe de ratones BALB/C (Figura 4). Los resultados son comparables con la capacidad del conjugado de tipo 3 para reducir la colonización del serotipo homólogo (Henrikson, J y col. Alcohol Clin Exp Res, 1997, 21:1630).

Títulos de ELISA específicos para antígeno de proteína asociada a la superficie de r20 kDa de *S. pneumoniae*.

Grupo	Sueros semana 4 día 5 IgG	Sueros semana 4 día 5 IgA
5 µg de r20 kDa + 0,1 µg de CT-E29H	79,726	1563
5 µg de conjugado de tipo 3 + 0,1 µg de CT-E29H	<50	<50
5 µg de KLH + 0,1 µg de CT-E29H	<50	<50
Nota: títulos del punto final determinados a partir de conjuntos de 5 ratones BALB/c		

Alineamiento de secuencias de la proteína PPP1 de 10 serotipos. Como se muestra en la Figura 6, la secuencia de PPP1 está muy conservada entre serotipos. Como puede verse, el serotipo 9 es el serotipo más divergente. La PP1 aislada de este serotipo mostró 15 diferencias de aminoácidos de la mayoría. Los serotipos restantes mostraron menos de 5 diferencias de aminoácidos. En la Figura 6 se muestra una secuencia consenso global de PPP1 (SEC ID N°: 20).

Amplificación de ARN. Se observa una banda discreta del tamaño esperado en tanto las muestras *in vitro* como *in vivo* (Figura 7). Se estimó que el tamaño del producto era de longitud completa mediante comparación con fragmentos de restricción Hae III de ADN lambda.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> American Home Products Corporation
Green, Bruce
Masi, Amy

- 5 <120> Proteína protectora recombinante de *Streptococcus pneumoniae*
<130> 0630/2H814
<140> TBA
<141> Simultáneamente con la presente
<150> US 60/258.841
- 10 <151> 28-12-2000
<160> 20
<170> PatentIn versión 3.1
<210> 1
<211> 30
- 15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador en 5'
<400> 1
ggggccatgg tctttccagt ttggtcaaaa
- 20 <210> 2
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Cebador en 3'
<400> 2
ggggtcgact tataaaccag gtgctgtcc aagttc
- 30 <210> 3
<211> 20
<212> PRT
<213> *Streptococcus pneumoniae*
<400> 3

Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu Thr Lys
1 5 10 15

Ala Ala Pro Val
20

<210> 4

<211> 537

5 <212> ADN

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

```
atgaatgagg taaagaaaat ggtagaattg aaaaaagaag cagtaaaaga cgtaacatca      60
ttgacaaaag cagcgccagt agcattggca aaaacaaagg aagtcttgaa ccaagctgtt      120
gctgatttgt atgtagctca cgttgctttg caccaagtgc actggtatat gcatggtcgt      180
ggtttccttg tatggcatcc aaaaatggat gagtacatgg aagctcttga cggccaattg      240
gatgaaatca gtgaacgctt gattacactc ggtggaagcc cattctctac attgacagag      300
ttccttcaaa atagtgaaat cgaagaagaa gctggtgaat accgtaatgt tgaagaaagc      360
ttggaacgtg ttcttggtat ctaccgttac ttgtcagaac ttttccaaaa aggtttggat      420
gtcactgatg aagaaggtga cgatgtgaca aacggtatct ttgcaggcgc taaaactgaa      480
acagataaaa caatttggat gcttgcagcc gaacttggac aagcacctgg tttgtaa      537
```

<210> 5

10 <211> 178

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

Met Asn Glu Val Lys Lys Met Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys
1 5 10 15

Asp Val Thr Ser Leu Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr
20 25 30

Lys Glu Val Leu Asn Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val
35 40 45

Ala Leu His Gln Val His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val
50 55 60

Trp His Pro Lys Met Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu

65 70 75 80

Asp Glu Ile Ser Glu Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser
85 90 95

Thr Leu Thr Glu Phe Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly
100 105 110

Glu Tyr Arg Asn Val Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr
115 120 125

Arg Tyr Leu Ser Glu Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu
130 135 140

Glu Gly Asp Asp Val Thr Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu
145 150 155 160

Thr Asp Lys Thr Ile Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro
165 170 175

Gly Leu

<210> 6

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala
35 40

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys
20 25

<210> 8

<211> 33

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Reverse cebador

<400> 8

15 ggggtcgact aaaccagggtg ctgtccaag ttc

<210> 9

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Forward cebador

<400> 9

ggggccatgg ctgtagaatt gaaaaaagaa

<210> 10

25 <211> 176

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 11

5 <211> 176

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 11

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 12

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 12

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Gly Ile Phe Glu Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 13

<211> 175

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 13

Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu Thr
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn Gln
20 25 30

Ala Val Ala Asp Leu His Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val His
35 40 45

Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met Asp
50 55 60

Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Thr Ser Glu Arg
65 70 75 80

Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe Leu
85 90 95

Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val Glu
100 105 110

Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu Leu
115 120 125

Phe Gln Lys Asp Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val Thr
130 135 140

Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile Trp
145 150 155 160

Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 14

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 14

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Asp Ile Phe Val Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 15

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 15

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Asp Ile Phe Val Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 16

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 16

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Asp Ile Phe Val Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 17

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 17

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val

130

135

140

Thr Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 18

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 18

```

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Val Lys Asp Val Thr Ser Leu
1          5          10          15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
          20          25          30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
          35          40          45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50          55          60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly Gln Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65          70          75          80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
          85          90          95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
          100          105          110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Val Ile Tyr Arg Tyr Leu Ser Glu
          115          120          125

Leu Phe Gln Lys Gly Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
          130          135          140

Thr Asn Gly Ile Phe Ala Gly Ala Lys Thr Glu Thr Asp Lys Thr Ile
145          150          155          160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
          165          170          175

```

<210> 19

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 19

Met Ala Val Glu Leu Lys Lys Glu Ala Ala Lys Asp Val Ala Arg Leu
1 5 10 15

Thr Lys Ala Ala Pro Val Ala Leu Ala Lys Thr Lys Glu Val Leu Asn
20 25 30

Gln Ala Val Ala Asp Leu Tyr Val Ala His Val Ala Leu His Gln Val
35 40 45

His Trp Tyr Met His Gly Arg Gly Phe Leu Val Trp His Pro Lys Met
50 55 60

Asp Glu Tyr Met Glu Ala Leu Asp Gly His Leu Asp Glu Ile Ser Glu
65 70 75 80

Arg Leu Ile Thr Leu Gly Gly Ser Pro Phe Ser Thr Leu Thr Glu Phe
85 90 95

Leu Gln Asn Ser Glu Ile Glu Glu Glu Ala Gly Glu Tyr Arg Asn Val
100 105 110

Glu Glu Ser Leu Glu Arg Val Leu Ala Ile Tyr Arg Tyr Leu Ile Thr
115 120 125

Leu Phe Gln Lys Ala Leu Asp Val Thr Asp Glu Glu Gly Asp Asp Val
130 135 140

Thr Asn Asp Ile Phe Val Gly Ala Lys Ala Glu Leu Glu Lys Thr Val
145 150 155 160

Trp Met Leu Ala Ala Glu Leu Gly Gln Ala Pro Gly Leu Val Asp Pro
165 170 175

<210> 20

<211> 176

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso

<400> 20

Met	Ala	Val	Glu	Leu	Lys	Lys	Glu	Ala	Val	Lys	Asp	Val	Thr	Ser	Leu
1				5					10					15	
Thr	Lys	Ala	Ala	Pro	Val	Ala	Leu	Ala	Lys	Thr	Lys	Glu	Val	Leu	Asn
			20					25					30		
Gln	Ala	Val	Ala	Asp	Leu	Tyr	Val	Ala	His	Val	Ala	Leu	His	Gln	Val
		35					40					45			
His	Trp	Tyr	Met	His	Gly	Arg	Gly	Phe	Leu	Val	Trp	His	Pro	Lys	Met
	50					55					60				
Asp	Glu	Tyr	Met	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Gln	Leu	Asp	Glu	Ile	Ser	Glu
65					70					75					80
Arg	Leu	Ile	Thr	Leu	Gly	Gly	Ser	Pro	Phe	Ser	Thr	Leu	Thr	Glu	Phe
				85					90					95	
Leu	Gln	Asn	Ser	Glu	Ile	Glu	Glu	Glu	Ala	Gly	Glu	Tyr	Arg	Asn	Val
			100					105					110		
Glu	Glu	Ser	Leu	Glu	Arg	Val	Leu	Val	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Leu	Ser	Glu
		115					120					125			
Leu	Phe	Gln	Lys	Gly	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Gly	Asp	Asp	Val
	130					135					140				
Thr	Asn	Gly	Ile	Phe	Ala	Gly	Ala	Lys	Thr	Glu	Thr	Asp	Lys	Thr	Ile
145					150					155					160
Trp	Met	Leu	Ala	Ala	Glu	Leu	Gly	Gln	Ala	Pro	Gly	Leu	Val	Asp	Pro
				165					170					175	

REIVINDICACIONES

1. Una proteína neumoprotectora (PPP) aislada asociada a la superficie de *S. pneumoniae* que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 5 y 10-19, o un fragmento de la misma, en la que dicha PPP o fragmento de la misma tiene la capacidad de reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retiene la función biológica de la interacción con hierro.
2. Una PPP o fragmento de la misma como se define en la reivindicación 1, en la que dicha PPP o fragmento de la misma es una proteína recombinante.
3. Una PPP o fragmento de la misma como se define en la reivindicación 2, teniendo dicha PPP un punto isoelectrónico de aproximadamente 4,587.
4. Una PPP o fragmento de la misma como se define en la reivindicación 3, teniendo dicha PPP una carga de aproximadamente 14,214 a pH 7.
5. Una PPP o fragmento de la misma como se define en la reivindicación 1, teniendo dicha PPP una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma.
6. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP o un fragmento de la misma como se define en la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de ácidos nucleicos tiene una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento de la misma.
7. Un ácido nucleico como se define en la reivindicación 6 que es un ADNc.
8. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP o fragmento de la misma como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 6, en la que dicha secuencia está operativamente asociada a una secuencia de control de la expresión.
9. Una célula huésped transfectada con el vector como se define en la reivindicación 8.
10. Un procedimiento para producir PPP recombinante o fragmento de la misma, procedimiento que comprende aislar dicha PPP o fragmento de la misma producido por las células huésped como se define en la reivindicación 9, en el que las células huésped se han cultivado en condiciones que proporcionan la expresión de dicha PPP o fragmento de la misma por dicho vector.
11. Una composición que comprende una PPP o fragmento de la misma como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Una composición que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una PPP o fragmento de la misma como se define en la reivindicación 6 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una composición que comprende el vector de expresión como se define en la reivindicación 8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición que comprende la célula huésped como se define en la reivindicación 9 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
15. Una composición inmunogénica que comprende (i) una PPP asociada a la superficie de *S. pneumoniae* o fragmento de la misma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
16. Una composición como se define en la reivindicación 15, teniendo dicha PPP o fragmento de la misma codificado por una secuencia de ácidos nucleicos una secuencia como se representa en SEC ID N°: 4, o un fragmento inmunogénico de la misma.
17. Una composición inmunogénica que comprende (i) al menos un vector de expresión según la reivindicación 8; (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y (iii) opcionalmente al menos un adyuvante.
18. Una composición como se define en la reivindicación 17, en la que dicha bacteria neumocócica es *Streptococcus pneumoniae*.
19. Una composición como se define en la reivindicación 15, 16 ó 18, en la que dicha composición provoca inmunidad protectora de una enfermedad producida por *Streptococcus pneumoniae*.
20. Una composición como se define en la reivindicación 19, en la que dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en otitis media, rinosinusitis, bacteriemia, meningitis, neumonía e infección del tracto respiratorio inferior.

21. Uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero, de una composición como se define en la reivindicación 15 ó 17.
- 5 22. Uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero que está infectado por bacterias neumocócicas, de un compuesto eficaz para inhibir la unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 para inducir dicha respuesta inmunitaria en dicho mamífero.
- 10 23. Un procedimiento para cribar un compuesto que induce una respuesta inmunitaria en un mamífero infectado por bacterias neumocócicas, comprendiendo dicho procedimiento comparar una primera cantidad de unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 en presencia de dicho compuesto con una segunda cantidad de unión de una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5 en ausencia de dicho compuesto; por lo que una primera cantidad de unión más baja que dicha segunda cantidad de unión indica que dicho compuesto puede inducir dicha respuesta inmunitaria en dicho mamífero.
- 15 24. Un procedimiento *in vitro* para diagnosticar infección bacteriana neumocócica, comprendiendo dicho procedimiento comparar el nivel de PPP como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en una muestra de la que se sospecha con el nivel de PPP como se representa en SEC ID N°: 5, o fragmentos de la misma, en una muestra de control, por lo que un nivel de dicha proteína neumoprotectora en dicha muestra sospechosa superior al nivel de dicha proteína neumoprotectora en dicha muestra de control indica que dicha muestra sospechosa comprende infección bacteriana neumocócica; en el que dicha PPP o fragmento de la misma tiene la capacidad de reducir la colonización de bacterias neumocócicas y retiene la función biológica de la interacción con hierro.
- 20 25. Un anticuerpo que reconoce selectivamente una secuencia de aminoácidos como se representa en SEC ID N°: 5, o un fragmento de la misma.
26. Un anticuerpo como se define en la reivindicación 25, que es quimérico.
27. Un anticuerpo como se define en la reivindicación 25, que es un anticuerpo monoclonal.
28. Un anticuerpo como se define en la reivindicación 25 ó 27, que es humanizado.
- 25 29. Un anticuerpo como se define en la reivindicación 25 ó 27, que es antiidiotípico.
30. Un anticuerpo como se define en la reivindicación 25 ó 27, que está conjugado con un compuesto farmacéuticamente activo.
31. Uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria contra infección neumocócica en un mamífero, de un anticuerpo como se define en la reivindicación 29.
- 30 32. Uso, en la fabricación de un medicamento para inducir una respuesta inmunitaria en un mamífero infectado por bacterias neumocócicas, de un anticuerpo como se define en la reivindicación 30.

FIG. 1

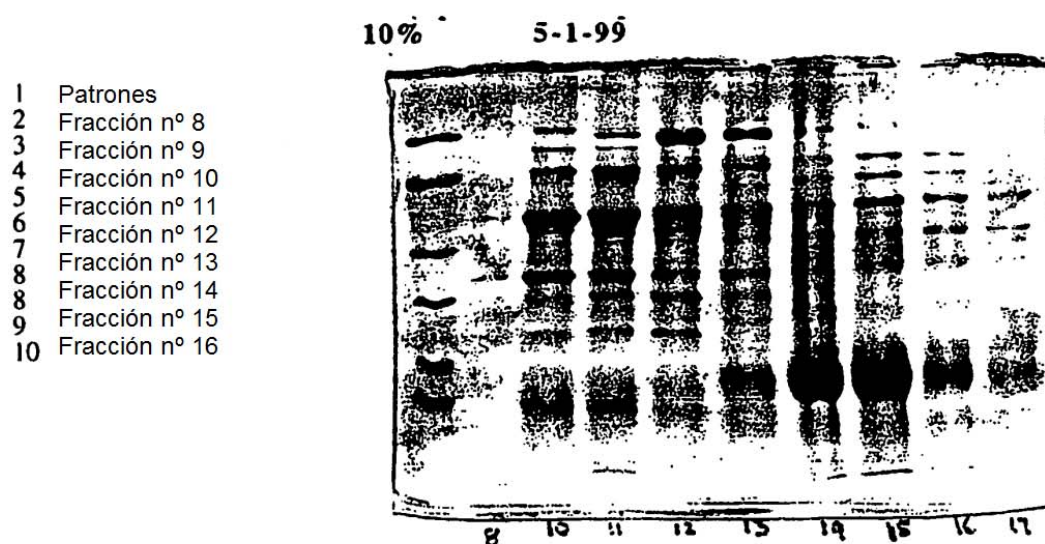


FIG. 2

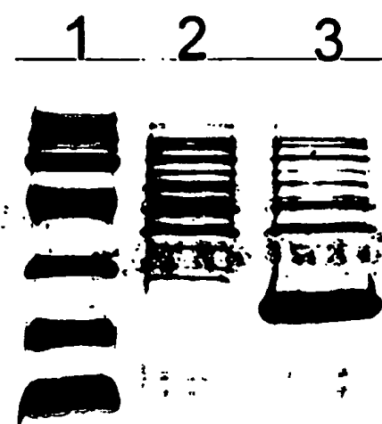


FIG. 3

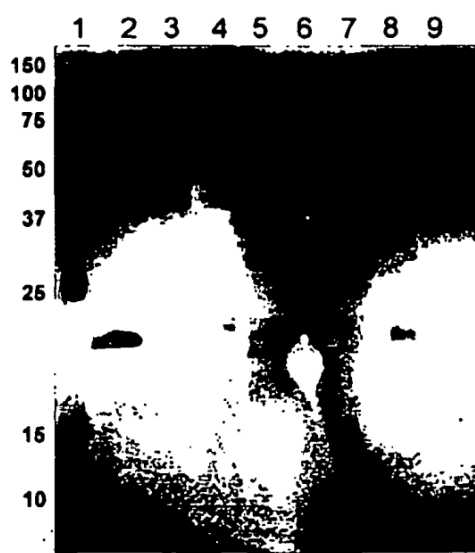


FIG. 4

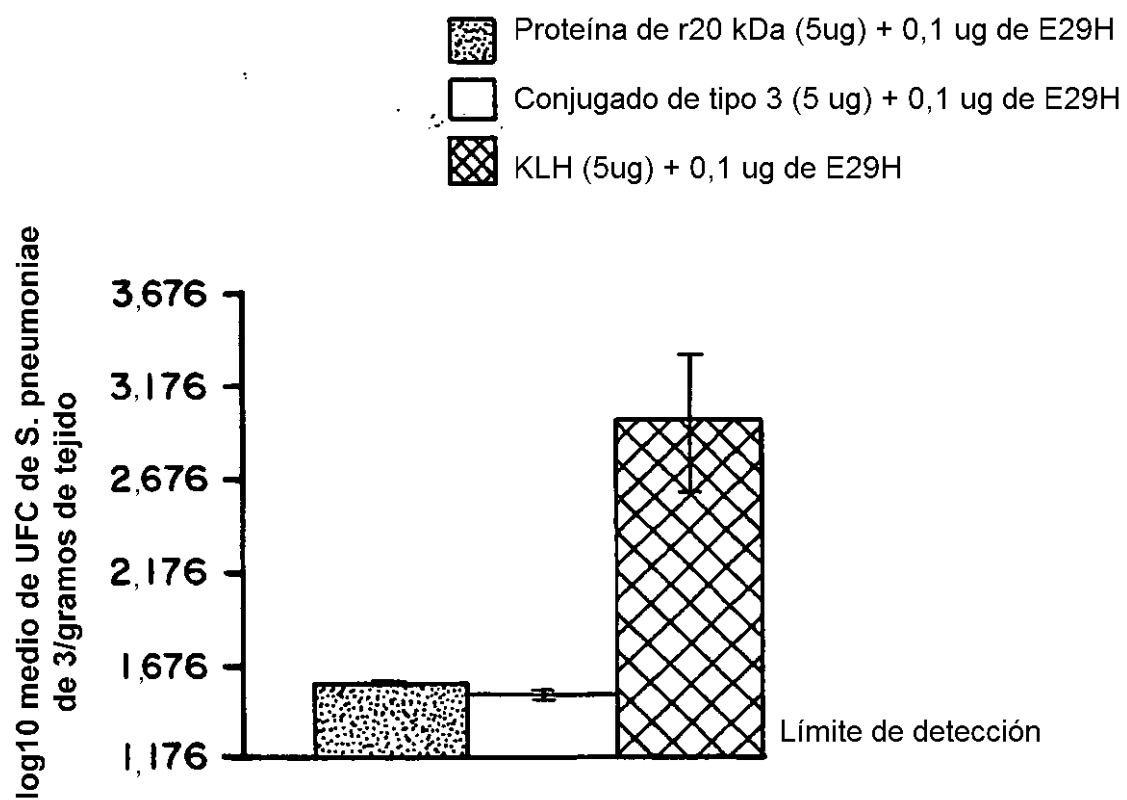


FIG. 5

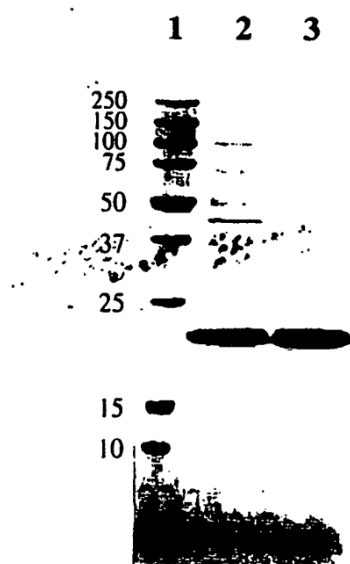


FIG. 7

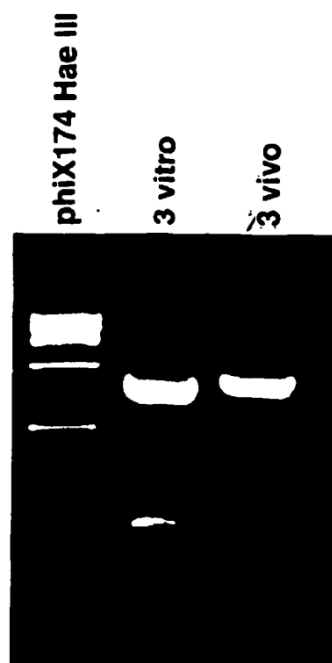


FIG. 6A

PPP1CP1200	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	50
PPP1TYPE1	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE14	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE18	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE23	(1)	-- AVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE3	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE4	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE5	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE6B	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE7	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
PPP1TYPE9	(1)	-- MAVELKKEAAKDVARTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	
consenso	(1)	MAVELKKEAVKDVTSLTKAAPVALAKTKEVLNQAVADLYVAHVVALHQV	51
PPP1CP1200	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	100
PPP1TYPE1	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE14	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE18	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE23	(48)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE3	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE4	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE5	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE6B	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE7	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
PPP1TYPE9	(49)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGHLDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	
consenso	(51)	HWYMHGRGFLVWHPKMDYMEALDGGQDDEISERLITLGGSPFSTLTTEFLQ	

A ————— A

FIG. 6B

A		A	
		101	150
PPP1CP1200	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE1	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE14	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE18	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE23	(98)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE3	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNDI	
PPP1TYPE4	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE5	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNDI	
PPP1TYPE6B	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE7	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
PPP1TYPE9	(99)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLAIYRYLITLTFQKALDVTDEEGDDVTNDI	
consenso	(101)	NSEIEEEAGEYRNVEESLERVLVIYRYLSELFQKGLDVTDEEGDDVTNGI	
		151	178
PPP1CP1200	(151)	FVGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 21)
PPP1TYPE1	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 10)
PPP1TYPE14	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 11)
PPP1TYPE18	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 12)
PPP1TYPE23	(148)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 13)
PPP1TYPE3	(151)	FVGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 14)
PPP1TYPE4	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 15)
PPP1TYPE5	(151)	FVGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 16)
PPP1TYPE6B	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 17)
PPP1TYPE7	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 18)
PPP1TYPE9	(149)	FVGAKAELEKTVWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 19)
consenso	(151)	FAGAKTETDKTIWMLAAELGQAPGLVDP	(SEQ ID NO: 20)